

Isolierung und Charakterisierung
eines Lipase-Inhibitors aus
Arachis hypogaea

Herbert Feuth

1974

Aus dem Institut für Klinische Chemie und
Klinische Biochemie der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Isolierung und Charakterisierung
eines Lipase-Inhibitors aus
Arachis hypogaea

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Herbert Feuth

München

1974

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Priv.-Doz. Dr. rer. nat. K. Hochstraßer
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. phil. E. Werle

Dekan : Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.5.1974



Danksagung

=====

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Karl Hochstraßer, möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und für die überaus wertvollen Ratschläge und Antworten auf die Fragen, mit denen ich jederzeit zu ihm kommen durfte, sehr herzlich danken.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Eugen Werle für die Anregung zu dieser Arbeit und die Gewährung eines Arbeitsplatzes (1971/72) sehr herzlich bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche Beratung und Hilfe.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
A) Einleitung	1
B) Theoretischer Teil	2
I. Neuere Vorstellungen zur Pathogenese der akuten Pankreatitis	2
II. Vorkommen und Bedeutung natürlicher Enzym-Inhibitoren. Dargestellt am Beispiel der Proteasen-Inhibitoren	6
1. Vorkommen natürlicher Inhibitoren	6
2. Physiologische Bedeutung	7
3. Wirkungsweise und Hemmtyp	8
4. Polyvalenz und Spezifität	8
5. Reaktives Zentrum	9
Zusammenfassung	9
III. Bemerkungen über die Pankreaslipase	11
1. Vorkommen lipolytisch wirksamer Enzyme	11
2. Eigenschaften der Pankreaslipase	14
3. Aktives Zentrum	16
4. Lipase-Aktivatoren und -Inhibitoren	18
IV. Zusammenfassung	23
Experimenteller Teil	25
C) Material und Methoden	25
I. Material	25
1. Enzyme	25
2. Substrat	25
3. Reagenzien und anderes Material	25
4. Herstellung der Gebrauchslösungen	26
5. Zubereitung der Lipidinhibitor-Emulsion	27
II. Methodik	29
1. Testverfahren zum Nachweis antilipolytischer Aktivität	29
2. Grundlagen des neuen Verfahrens zur Isolierung eines Lipasehemmstoffes aus Lipiden von <i>Arachis hypogaea</i>	32
2.1 Lipidextraktion	32
2.2 Grundlagen der Chromatographie	32

	<u>Seite</u>
2.2.1 Technik der Säulenchromatographie	35
2.2.2 Technik der Dünnschichtchromatographie	36
2.2.3 Prinzip der Gaschromatographie	42
D) Eigene Untersuchungen und Ergebnisse	44
Beschreibung und Diskussion der einzelnen Schritte des Isolierungs- und Charakterisierungsverfahrens für einen Lipasehemmstoff aus Lipiden von <i>Arachis hypogaea</i>	44
I. Isolierungsverfahren	44
1. Schritt: Fettreiche Pflanzensamen homogenisieren, Lipidextrakte herstellen, anschließend diese nach Emulgierung auf Antilipasewirkung testen	44
2. Schritt: Erstellung einer Hemmkurve und Untersuchungen zur Charakterisierung des Hemmverhaltens	49
3. Schritt: Dünnschichtchromatographische Vorversuche zur Ermittlung eines optimal wirkenden Trennmittels für den Erdnußgesamtlipidextrakt	50
4. Schritt: Erste präparative säulenchromatographische Vorfraktionierung des Gesamtlipidgemisches aus Pflanzensamen von <i>Arachis hypogaea</i> bei gleichzeitiger d.c. Kontrolle der eluierten Fraktionen	53
5. Schritt: Prüfung der durch die säulenchromatographische Vorfraktionierung gewonnenen Lipidfraktionen auf Hemmwirkung	56
6. Schritt: Bestimmung der Lipase-inhibitorisch wirksamen Komponente durch Auskratzen der einzelnen Lipidkomponenten auf den Dünnschichtchromatogrammen	59
7. Schritt: Isolierung der inhibitorisch wirksamen Komponente durch Rechromatographie der antilipolytisch aktiven Fraktionen	62
II. Charakterisierungsverfahren	65
Nähere Charakterisierung der inhibitorisch aktiven Lipidkomponente	65
1. Schritt: Phospholipidnachweis	65
2. Schritt: Alkalische Hydrolyse	67

	<u>Seite</u>
3. Schritt: Gaschromatographische Analyse des inhibitorisch wirksamen Lipids	69
E) Schlußbemerkung	76
Literaturverzeichnis	77
Lebenslauf	

A) EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit hat die Isolierung und Charakterisierung eines Pankreaslipase-Inhibitors aus Lipiden von *Arachis hypogaea* zum Ziel.

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren zwei Überlegungen:

1. Neuere Erkenntnisse zur Pathogenese der akuten Pankreatitis geben Anlaß, nach Inhibitoren für lipolytisch wirksame Enzyme zu suchen.
2. Da die Wirkungsmechanismen bei der Inhibierung hydrolytischer Enzyme durch spezifische natürliche Inhibitoren bisher vorwiegend am Beispiel der Proteaseinhibitoren untersucht worden sind, interessierte die Frage, ob für Lipase (bzw. für lipolytisch wirksame Enzyme) ähnliche Hemmstoffe und Hemmechanismen wie bei den Proteasen zu erwarten sind.

B) THEORETISCHER TEIL

I. Neuere Vorstellungen zur Pathogenese der akuten Pankre titis

Seit der Jahrhundertwende wird die Autodigestion des Pankreas als das wesentliche pathogenetische Prinzip der akuten Pankreatitis angesehen. Die für das Krankheitsbild charakteristischen pathologisch-anatomischen Befunde am Pankreas und in seiner Umgebung (Pankreasparenchymnekrose, Fettgewebnekrosen, Ödeme, Hämorrhagien) lassen sich am ehesten als Folge einer lokalen Wirkung von Verdauungsenzymen deuten.

Den proteolytisch wirksamen Enzymen, besonders Trypsin, wurde dabei bis in jüngster Zeit die Hauptbedeutung zugesprochen.

Dies wurde jedoch in Frage gestellt, nachdem bei tierexperimentell erzeugten Pankreatitiden aktives Trypsin im Pankreas nicht nachgewiesen werden konnte. (1, 2, 3, 4, 5)

Nach neueren gegenwärtigen Kenntnissen kann man sich trotz noch vieler unbekannt bleibender Faktoren folgende Vorstellung machen: Die amylolytischen und lipolytischen Enzyme werden im Pankreas in aktiver Form gebildet. Dagegen werden die proteolytischen Enzyme in Form inaktiver Vorstufen synthetisiert. Die autokatalytische Aktivierung dieser Proteasen hat man bis vor kurzem für die Autodigestion des Pankreas verantwortlich gemacht.

Trypsinogen wird erst im Duodenum durch die im Bürstensaum der Darmepithelien gebildete Enterokinase zu Trypsin aktiviert. Es aktiviert seinerseits die ins Duodenum gelangenden proteolytischen Zymogene zu Trypsin, Chymotrypsin, Elastase und Carboxypeptidase sowie Kallikrein.

Ein weiterer Schutzmechanismus besteht darin, daß mit den Zymogenen Trypsininhibitoren simultan sezerniert werden, die eine temporäre Hemmung etwa aktivierter Proteasen bewirken.

Die proteolytische Aktivität kann somit unter normalen Verhältnissen nur im Duodenum auftreten.

Aber selbst aktivierte proteolytische Enzyme können gesundes Gewebe nicht angreifen. Parenchymnekrosen konnten nicht beobachtet werden, höchstens intra- und peripankreatische Ödeme.

(5, 6)

Wird das Pankreas jedoch durch Ischämie oder durch Drucksteigerung im Gangsystem geschädigt, so vermindert sich seine Resistenz gegenüber aktiven Enzymen.

Es fällt schwer, einem einzelnen Enzym in der Entstehung der akuten Pankreatitis die Hauptrolle zuzuschreiben. Es scheinen vielmehr alle Enzyme direkt oder indirekt beteiligt zu sein.

Neuere Untersuchungen machen für die Entstehung einer akuten Pankreatitis jedoch vorwiegend drei Enzyme verantwortlich:

(8, 9, 10)

a) Pankreaslipase

b) Phospholipase

c) Elastase

Während die pathogenetischen Überlegungen bisher fast ausschließlich auf die proteolytischen Enzyme ausgerichtet waren, wurde den lipolytischen Verdauungsenzymen des Pankreas bisher wenig Beachtung geschenkt.

Die Betrachtung dieser Enzyme scheint aber insbesondere bei der Annahme eines möglichen Refluxes von Galle oder gallesäurehaltigen Duodenalinhalt in den Pankreasgang von Interesse, da sie durch Gallensäuren im Sinne einer Substrataktivierung aktivierbar sind.

a) Pankreaslipase

Balo (11) äußerte erstmals die Vermutung, daß die Lipase für die Entstehung der Pankreasnekrose verantwortlich sei.

Von Wanke (12) wurden nach Lipaseinstillation in den Pankre-

ausgang von Hunden Veränderungen beobachtet, die Beziehungen zur Pankreatitis des Menschen erkennen ließen.

In jüngster Zeit berichten Anderson et al. (13) über die Auflösung hämorrhagischer Pankreasnekrosen bei Hunden durch intraduktuläre Infusion von Lipase.

Schmidt (14) konnte fernerhin zeigen, daß in Gegenwart aktivierender Substanzen (Gallensäuren) die Lipase typische Fettgewebsnekrosen hervorruft.

Dabei spielt möglicherweise die hohe intrazelluläre Konzentration an Fettsäuren, die bei der Lipolyse der in den Fettvakuolen gespeicherten Triglyceriden entsteht, eine Rolle.

b) Phospholipase-A

Das menschliche Pankreas ist besonders reich an diesem Enzym. (15, 16)

Es katalysiert die Abspaltung einer Fettsäure von Lecithin, Kephalin und wahrscheinlich von anderen Glycerophospholipiden. Dadurch werden deren Lysoverbindungen (Lysolecithin, Lysokephalin) gebildet, die eine starke Cytotoxizität und hämolytische Wirkung besitzen.

Deshalb ist das Dünndarmepithel durch eine Lysophospholipase (Phospholipase-B) gegen die cytotoxische Wirkung der Lyso-phospholipide geschützt. Schmidt et al. beobachteten nach Injektion einer 2 %igen Lysolecithinlösung in den Pankreasgang von Ratten Parenchymnekrosen des ganzen Pankreas und Fettgewebsnekrosen des gesamten Bauchraums. (6, 15, 17)

Phospholipase-A allein führt bei Injektion ins Pankreas der Ratte zu keinen Nekrosen.

Aber schon in Gegenwart geringster Galle-mengen, deren wesentlicher Bestandteil Lecithin ist, kommt es zu schwersten Nekrosen. In einem solch nekrotischen Pankreas lassen sich hohe Konzentrationen an Lysolecithin nachweisen. (15, 17)

Gjone und Arnesjö (18, 19) konnten zeigen, daß es nach retrograder Injektion von Trypsin und Gallensäuren in den Pankre-

ausgang von Hunden zu einem raschen Auftreten aktiver Phospholipase-A im Pankreasexsudat kommt. Fernerhin ließen sich hohe Konzentrationen an cytotoxischem Lysolecithin nachweisen. Im Pankreas von an akuter Pankreatitis Verstorbenen lassen sich ebenfalls hohe Konzentrationen von Lysolecithin nachweisen.

e) Elastase

Es handelt sich um ein proteolytisch wirksames Enzym, das durch Pepsin aus einem inaktiven Vorstadium aktiviert wird und dessen Wirkung bei einer Pankreatitis darin bestehen soll, daß es die elastischen Fasern der Gefäße angreift, auflöst und somit Blutungen verursacht. (8)

Zusammenfassung

Diese soeben geschilderten neueren Erkenntnisse zur Pathogenese der akuten Pankreatitis und besonders die im neuen Licht erscheinende Rolle der Pankreaslipase für die Entstehung einer Pankreatitis sind Anstoß, nach Möglichkeiten zu suchen, die Wirkung dieses Enzyms durch Inhibitoren zu hemmen.

II. Vorkommen und Bedeutung natürlicher Enzym-Inhibitoren

Natürliche Enzym-Inhibitoren spielen bei biologischen Regulationsvorgängen eine wichtige Rolle.

Die Steuerung dieser Stoffwechselvorgänge geschieht durch Enzyme. Enzyme sind Katalysatoren der lebenden Zelle von Proteincharakter. Verantwortlich für ihre katalytische Wirksamkeit ist das "aktive Zentrum", das durch besondere Faltung bestimmter Teile von Polypeptidketten entsteht und das eine ausgesprochene Affinität zu dem für jedes Enzym charakteristischen Substrat besitzt. Der großen Gruppe von Enzymen läßt sich die biologisch und medizinisch wichtige Gruppe von Enzym-Inhibitoren zuordnen.

Die Wirkungsmechanismen bei der Inhibierung hydrolytischer Enzyme durch spezifische natürliche Inhibitoren wurden besonders intensiv am Beispiel der Proteaseinhibitoren untersucht, seit im Jahre 1929 Kraut, Frey und Werle im Lymphknoten, Parotis, Milz und Leber des Rindes einen Hemmstoff für Kallikrein beschrieben. (7, 20 - 31)

Viele Arbeitsgruppen versuchen inzwischen Inhibitoren verschiedenster Herkunft rein darzustellen, chemisch zu charakterisieren, den Reaktionsmechanismus der Inhibitoren mit den entsprechenden Enzymen zu studieren und sowohl in vitro wie in vivo ihre physiologischen Funktionen aufzuklären. (32 - 66)

Um die Frage abzuklären, ob für Pankreaslipase ähnliche Hemmstoffe und Hemmechanismen wie bei den Proteasen vorkommen - bis jetzt sind in der Literatur noch keine natürlichen Inhibitoren für Pankreaslipase beschrieben worden - bedarf es einer kurzen Skizzierung der Proteaseinhibitoren.

1. Vorkommen natürlicher Inhibitoren

Natürliche Inhibitoren für proteolytische Enzyme kommen in

Tieren und Pflanzen vor.

Seit den Arbeiten von Kraut, Frey und Werle (7, 20 - 31) wurden viele pflanzliche und tierische Inhibitoren isoliert und ihre Eigenschaften beschrieben.

Eine gute Übersicht bieten die Monographie von Vogel, Traut-schold und Werle (7) und die Monographie "1st Conference on Proteinase Inhibitors" von Fritz und Tscheche. (71)

2. Physiologische Bedeutung

Physiologische Aufgaben der natürlichen Inhibitoren:

Allgemein läßt sich die Aufgabe der in der Natur mannigfaltig vorkommenden Inhibitoren darin sehen, biologisch wichtige Proteinlösungen und Gewebe von Proteinstruktur vor körpereigenen und fremden proteolytischen, esterolytischen und evtl. kininliberierenden Enzymen zu schützen. In vielen Organen existieren Inhibitoren und Enzyme nebeneinander. Dabei regeln und kontrollieren u.a. die Inhibitoren die katalytische Aktivität der Enzyme.

Nach Mansfield sollen die pflanzlichen Inhibitoren folgende Bedeutung haben:

Sie spielen allgemein eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der latenten Lebensform durch Hemmung der Autolyse. Es wird einerseits ein Schutz vor Autolyse während des Ruhestadiums oder vor Eindringen von Viren, Bakterien und Pilzen vermutet, andererseits wird eine Steuerung der Stoffwechselvorgänge durch Inhibitoren diskutiert. (67, 68)

Die Bedeutung der Proteasen-Inhibitoren bei Mensch und Tier liegt also

1. im Schutz gegen äußere Einflüsse,
2. in der zeitlichen und räumlichen Begrenzung proteolytischer Vorgänge im Organismus.

3. Wirkungsweise und Hemmtyp

Die biochemische Wirkung der Proteinase-Inhibitoren beruht im allgemeinen auf einer reversiblen Bindung des Inhibitors an die betreffende Proteinase.

Die Lage des Gleichgewichts $E + I \rightleftharpoons EI$ wird dabei bestimmt durch die aktuelle H^+ -Konzentration, das Konzentrationsverhältnis Enzym zu Inhibitor und evtl. durch die Substratkonzentration im Medium.

Das reaktive Zentrum des Inhibitors lagert sich an das aktive Zentrum des Enzyms an.

Auf diese Weise bilden beide Partner zusammen einen stabilen Komplex, und die proteolytische Aktivität des Enzyms ist blockiert.

Konkurrieren Substrat und Inhibitor um die Besetzung des aktiven Zentrums am Molekül, so liegt eine sogenannte kompetitive Hemmung vor.

Die relative Affinität des Enzyms zum Inhibitor bzw. zum Substrat einerseits und die Konzentration von Inhibitor und Substrat andererseits bestimmen hier das Ausmaß der Hemmung. Die meisten Inhibitoren verhalten sich nach diesem Hemmechanismus. Eine andere Gruppe von Inhibitoren folgt dem Prinzip der nicht kompetitiven Hemmung.

Laskowski und Wu (69) beobachteten 1953, daß der Komplex von Trypsin mit Kazal-Inhibitor nach längerer Inkubation in freies Trypsin und tryptische Spaltprodukte des Inhibitors zerfällt. Sie führten den Begriff "temporary inhibition" für diese Reaktion ein.

4. Polyvalenz und Spezifität

Wie bereits angedeutet, können manche Inhibitoren die proteolytische Eigenschaft verschiedener Enzyme unterbinden, besitzen also polyvalenten Hemmcharakter.

So umfaßt das Hemmspektrum des polyvalenten Inhibitors aus Rinderorganen (Trasylol^R) sämtliche Organkallikreine, Serinkallikreine, Trypsin, Chymotrypsin A und B sowie Plasmin. (20 - 40)

Neben der Gruppe polyvalenter Inhibitoren wurden zahlreiche Inhibitoren vor allem von Frits und Werle entdeckt, die jeweils nur ein Enzym zu hemmen vermögen. Die meisten dieser spezifischen Hemmstoffe inhibieren lediglich Trypsin.

(37 - 40)

5. Reaktives Zentrum

Die meisten der von natürlichen Inhibitoren hemmbaren Enzyme besitzen im aktiven Zentrum, an dem sich die Umsetzung des Substrates vollzieht, einen Serinrest.

Für die Ausbildung des Trypsin-Inhibitor-Komplexes ist wahrscheinlich ein spezifischer Lysin- oder Argininrest im reaktiven Zentrum des Inhibitors verantwortlich.

Durch chemische Modifizierung der Lysin- oder Argininreste läßt sich die Hemmaktivität von Inhibitoren reversibel aufheben. (70)

Zusammenfassung

Grundsätzlich läßt sich also über die Proteasen-Inhibitoren folgendes sagen:

Proteasen-Inhibitoren stellen als Polypeptide Substrate für die entsprechenden Enzyme dar, die mit ihren sogenannten reaktiven Zentren mit den aktiven Zentren der Proteasen reagieren. Diese Reaktion kann bis zur Spaltung der am reaktiven Zentrum beteiligten Peptid-Bindung führen ohne Verlust der Inhibitor-Wirkung. Der Zerfall in Reaktionsprodukte und freies Enzym unterbleibt infolge der spezifischen Raumstruktur der Inhibitoren.

Es gibt aber auch Fälle, bei denen die Spaltung besonders bei

Enzymüberschuß langsam zum weiteren Abbau des Inhibitors und zur Reaktivierung des Enzyms führt.

Man spricht in diesem Zusammenhang in dem einen Fall von permanenter, im anderen von temporärer Hemmung. (71, 138).

III. Bemerkungen über die Pankreaslipase

Die Geschichte der Lipase steht in enger Beziehung mit der Geschichte der Entwicklung der Enzym-Pathologie und Enzymdiagnostik.

Sie beginnt zu Anfang dieses Jahrhunderts mit der Entdeckung der Vermehrung der Amylase im Harn- und Blutserum bei akuter Pankreasnekrose durch Wohlgemuth. (72)

Mit der Einbeziehung der Lipase bei der Diagnostik einer akuten Pankreatitis konnte Rona 1911 einen weiteren wichtigen Fortschritt in der Enzymdiagnostik erzielen. (73)

Seitdem wurde in der Literatur eine große Anzahl von zum Teil sehr unterschiedlichen Methoden zur exakten quantitativen und qualitativen Bestimmung der Lipase von den verschiedensten Autoren mitgeteilt. (74 - 86)

Die Pankreaslipase wird in den Acinuszellen des exokrinen Anteils des Pankreas synthetisiert.

Diese Zellen produzieren mehrere Enzyme - Lipase, Phospholipase, Amylase, Nuclease und Proteasen--, die alle eine außerordentliche Rolle bei der Verdauung spielen.

Bei der Pankreaslipase handelt es sich um ein wasserlösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 48.000. Dabei soll es sich um eine einzige Peptidkette handeln, die 4 Methionin-Moleküle, 7 Tryptophan-, 10 Histidin-Moleküle sowie 6 Disulfidbrücken und 2 freie SH-Gruppen pro Molekül besitzt. (87)

1. Vorkommen lipolytisch wirksamer Enzyme

Eine Untersuchung von Mendel und Mitarbeiter (90) zeigt, daß Lipasen in der Natur ubiquitär verbreitet sind.

Es ist wohl anzunehmen, daß jede lebende Zelle Enzyme dieser Art besitzt.

Über die quantitativen Verhältnisse bestehen bis heute nur unzureichende Informationen. Die wichtigsten Vorkommen von Lipase in Sekreten, Exkreten und Geweben sollen im folgenden

kurz skizziert werden:

Dünndarm-Schleimhaut

Die Resorption der Triglyceride hat schon früh das Interesse von Physiologen und Biochemikern gefunden (98), da die Aufnahme dieser völlig wasserunlöslichen Substanzen eine bemerkenswerte Leistung der Darmschleimhaut darstellt. Einen Überblick über die heutigen Kenntnisse von den Vorgängen bei der Fettresorption geben die Arbeiten mehrerer Autoren. (97, 98, 100)

Es wurde in der Dünndarm-Schleimhaut eine Lipase gefunden, die sich in ihren Eigenschaften von der Pankreaslipase dadurch unterscheidet, daß sie bevorzugt Tributyrin hydrolysiert. (100)

Außerdem setzt sie Monoglyceride langkettiger Fettsäuren um. (99)

Dieses Enzym bewirkt intrazellulär die hydrolytische Spaltung kurz- und mittelkettiger Triglyceride, die ungespalten von den Mucoszellen aufgenommen werden können.

Die entstandenen Fettsäuren mit 4 bis 10 Kohlenstoffatomen werden dann nicht wieder verestert, sondern in freier Form in das Blut sezerniert, wo sie an Serumalbumin gebunden über das Portalvenensystem in den Kreislauf gelangen. (99, 100)

Frauenmilch

An Säuglingen, die an Mucoviscidose (zystische Pankreasfibrose) erkrankt waren, konnte gezeigt werden, daß - solange die Säuglinge ausschließlich gestillt werden - Zeichen von Verdauungsstörungen kaum vorhanden sind.

Man führt dies auf den Enzymgehalt der Frauenmilch an Lipase und Peptidasen zurück. (92)

Magen

Die schon länger bekannte Magenlipase (101) wurde kürzlich

genauer charakterisiert. Sie unterscheidet sich von der Pankreaslipase durch ein niedrigeres MG und durch ein niedrigeres pH Optimum (pH 4.7) und ist von höherer Säurestabilität (pH 2).

Was die Substratspezifität angeht, so werden vor allem kurzkettige Triglyceride mit Fettsäuren einer Kettenlänge von 4 - 8 Kohlenstoffatomen hydrolysiert.

Da sie die in der Milch enthaltenen Fette jedoch auch in Abwesenheit von Gallensäuren hydrolysiert, wird angenommen, daß sie bei Säuglingen zur Verdauung des Milchfettes beiträgt.

Harn

Weit verbreitet ist die Ansicht, daß die Pankreaslipase im Harn ausgeschieden wird. (137, 139, 140)

Nachlas und Blackburn (141) berichten außerdem noch über die Anwesenheit eines Lipase-Hemmstoffes im Harn. Dieser Inhibitor soll thermostabil sein und durch 24-Stunden-Dialyse aus dem Harn entfernbar sein.

Jedoch war er nur bei β -Naphthyllaurat als Substrat nachweisbar. Diesen Arbeiten stehen neuere exakte Untersuchungen von H. Goebell und W. Rick entgegen. (85, 102, 114, 115)

Diese Autoren konnten selbst im Harn von Pankreatitis-Kranken keine Lipaseaktivität nachweisen.

Serum

Im Serum kommen mehrere nahe miteinander verwandte lipolytisch wirksame Enzyme vor, deren Spezifitätsbereiche sich weitgehend überschneiden, weshalb eine befriedigende Bestimmung der einzelnen Enzymaktivitäten auf große Schwierigkeiten stößt. Entsprechend ihren verschiedenartigen Verhalten gegenüber bestimmten Substraten und Hemmstoffen konnten Aldridge et al. (103, 104) zeigen, daß es sich größtenteils um Esterasen handelt. Die Konzentration der echten Lipase im normalen Serum ist sehr gering. (116, 117). Sie steigt

nur bei akuter Pankreatitis sowie bei perforierten Duodenalgeschwüren. (8, 117, 118)

Bei der im pathologischen Serum beobachteten Lipaseaktivität handelt es sich immer um Pankreaslipase.

Pankreas

Das Pankreas ist das lipasenreichste Organ. Über die Eigenschaften der Pankreaslipase soll im folgenden ausführlich berichtet werden.

2. Eigenschaften der Pankreaslipase

Substratspezifität

Bei der Lipase handelt es sich um ein Enzym oder genauer um eine Gruppe von Triglycerid-spaltenden Enzymen (Glycerin-ester-Hydrolasen, E.C. 3.1.1.3), die praktisch in allen Säugetierorganen vorkommen, in größeren Mengen aber nur im Pankreas bei Mensch und Säugetieren. (79, 85, 89, 90, 91, 105) Sie stellt eine Untergruppe der Carboxyl-ester-Hydrolasen (Carbonsäure-Esterasen, 3.1.1.) dar. (79, 85, 90)

Da - mit Ausnahme der Lipase aus Schweinepankreas - bisher nur Aktivitäten, aber keine einheitlichen Enzym-Proteine untersucht worden sind, sind Substrat und Inhibitorspezifität sowie weitere Eigenschaften der lipolytisch wirksamen Enzyme noch weitgehend ungeklärt. Soweit die Substratspezifität der Lipase untersucht ist, hydrolysiert sie Triglyceride mittel- und langkettiger Fettsäuren. (85 - 92, 105)

Da Triglyceride nicht wasserlöslich sind, müssen sie bei der enzymatischen Spaltung in emulgierter Form vorliegen. (87, 85)

Im Magen-Darm-Kanal wird die Emulgierung durch die Salze der Gallensäuren erreicht. (92)

Mit gereinigter Lipase aus menschlichem Pankreassekret konnte die Substratspezifität dieses Enzyms geklärt werden. (92)

Läßt man gereinigte menschliche Pankreaslipase auf optimal emulgierte Triglyceride von Fettsäuren verschiedener Kettenlänge einwirken, so ergibt sich, daß die höchste Aktivität gegenüber Tricaprylin gemessen wird.

Tributylin und Triolein werden etwa halb so schnell gespalten, während Triacetin und 1-Monoolein nicht umgesetzt werden. Die Aktivität gegenüber 1,3 Diolein ist relativ gering. Im Gegensatz hierzu werden durch kristallisierte Schweineleberesterase nur Triglyceride kurz- und mittelkettiger Fettsäuren wie Triacetin, Tributyrin und Tricaprylin, nicht aber Triolein hydrolysiert, so daß Lipase und Esterase aufgrund ihrer Substratspezifität unterschieden werden können.

Eine spezifische Aktivitätsbestimmung für Pankreaslipase ist nur mit Triolein bzw. dem zu 85 % aus Triolein bestehenden Olivenöl als Substrat möglich, da alle anderen Triglyceride - bevorzugt Triglyceride kurz- und mittelkettiger Fettsäuren wie Triacetin, Tributyrin und Tricaprylin - auch von kristallisierter Schweineleberesterase gespalten werden. (92 - 94) Worauf die im Vergleich zu Triolein etwa viermal höhere Aktivität des Enzyms gegenüber Olivenöl beruht, konnte bisher nicht geklärt werden. (92)

Synthetische Fettsäureester - wie Tween 85, 80, 20, Fluoresceindilaurat, p-Nitrophenyllaurat, p-Nitrophenyloleat und -palmitat - sind nicht zur Bestimmung der Aktivität der Pankreaslipase geeignet, da sie vom gereinigten Enzym nicht hydrolysiert werden. (95, 96)

Dabei spielt es keine Rolle, ob sie in Lösung oder als Emulsion vorliegen. Jedoch stellen diese synthetischen Substanzen Substrate für die Leberesterase dar. (95, 96)

Im Gegensatz zu Carboxyl-Esterase (Carboxylester-Hydrolase, E.C. 3.1.1.1.) entfaltet die Pankreaslipase ihre Wirkung nur an der Grenzfläche zwischen Fetttröpfchen und umgebender wässriger Phase, d.h. sie wirkt nur auf wasserunlösliche, emulgierte Substrate. (85, 89, 90)

Desnuelle et al. konnten zeigen, daß diese sogenannte Interphasenkonzentration maßgeblich für die Hydrolyserate gegenüber unlöslichen langkettigen emulgierten Triglyceriden durch Pankreaslipase ist.

Je größer die Öl-Wasser-Interphase ist, um so mehr Enzymmoleküle werden in ihr adsorbiert, d.h. daß die Reaktionsgeschwindigkeit ein Maximum erreicht, wenn vollkommene Adsorption der Enzymmoleküle vorliegt.

Über die Vorgänge an dieser Grenzfläche herrscht im einzelnen noch keine absolute Klarheit.

3. Aktives Zentrum

Ausgehend von der Überlegung, daß es sich bei der Pankreaslipase um einen speziellen Typ einer Esterase handelt, vermutete Desnuelle (87), daß auch die Pankreaslipase im aktiven Zentrum (centre catalytique), an dem sich ja die Umsetzung des Substrats vollzieht, einen Serin-Histidinrest besitzt.

Erste experimentelle Untersuchungen schienen aber zu dieser Hypothese im Widerspruch zu stehen.

Normalerweise werden nämlich Enzyme mit aktiven Zentren dieser Art durch DFP (Diisopropylfluorophosphat) oder durch E 605 (Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat) im Molverhältnis 1 : 1 vollständig inaktiviert, da DFP und E 605 den Serinrest phosphorylieren..

Bei der Pankreaslipase führten diese Organophosphate zu keiner Hemmung.

Hingegen führten konzentrierte Lösungen von E 605 in Gegenwart von Gallensalzen zu einer raschen und starken Hemmung. Bei Verwendung von radioaktiv markiertem Phosphor (^{32}P) ließ sich feststellen, daß jeweils 1 Atom Phosphor pro Molekül-enzym gebunden wird unter gleichzeitiger Freisetzung eines Moleküls p-Nitrophenol. (88)

Desnuelle et al. gelang es, ein radioaktiv markiertes Peptid-

bruchstück zu isolieren, das folgende Aminosäurezusammensetzung hat:

- Leu - Serin - Gly - His



Dabei stellt das Phosphor ein radikales Orthophosphor dar, dessen Bindung an Serin zu einer Hemmung des Enzyms führt. Diese Sequenz besitzt trotz weitgehender Übereinstimmung mit der Sequenz von Esterasen doch bestimmte signifikante Unterschiede:

So findet sich rechts vom Serin ein Glycin, dessen schwache Bindung im Prinzip die Anlagerung des Substrats erleichtern müßte.

Links vom Serin befindet sich ein hydrophob wirkendes Leucinmolekül anstelle des üblicherweise dort sitzenden Asparaginsäuremoleküls, dessen Rolle bei der Aktivierung der Proteasenzymogene bekannt ist.

Die zweite Stelle rechts vom Serin ist durch ein Histidin besetzt. Durch spezielle Untersuchungen (z.B. Photooxydation) des Enzyms konnte nachgewiesen werden, daß ein Verschwinden des Histidinanteils zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. (87)

Es bleibt aber nach Betrachtung der Peptidsequenz noch immer die Frage offen, wo der wesentliche Unterschied zwischen Lipase und Esterase liegt und warum einmal ein Enzymmolekül wie eine Lipase und zum anderen wie eine Esterase wirkt.

Hierfür gibt Desnuelle zwei Erklärungen:

1. Er vermutet, daß das Lipasemolekül im Gegensatz zu den meisten Proteinen an seiner Oberfläche einen großen hydrophoben Anteil besitzt, der die Bindung des Moleküls an die ebenfalls hydrophobe Zwischenphase erleichtert und damit letztlich verantwortlich sein soll für die spezifische Reaktionsform der Lipase in heterogenen Systemen.
2. Aus der Tatsache, daß sich das Lipasemolekül völlig

inaktiv in einem homogenen System verhält, glaubt Desnuelle schließen zu können, daß es erst im Moment der Adsorption des Lipasemoleküls an die Zwischenphase zu einer Aktivierung des Enzyms kommt, und zwar aufgrund einer begrenzten Veränderung innerhalb des Moleküls.

Dabei soll es sich bei einer Lipase, die gelöst vorliegt, um eine Art Prolipase - ähnlich den Zymogenen des Pankreas - ohne wirksames aktives Zentrum handeln.

Erst durch eine geringfügige Veränderung des Enzymmoleküls würde das aktive Zentrum wirksam.

Dabei würde die Adsorption an der Grenzfläche eine ähnlich wesentliche Rolle spielen, wie sie bei der Aktivierung der Zymogene das Trypsin einnimmt, indem es nämlich eine Abspaltung einer Peptidkette bewirkt.

Diese Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, daß es bisher nie gelungen ist, in einem Milieu ohne Interphase ein Lipasemolekül mit einem aktiven Zentrum zu isolieren.

4. Lipase-Aktivatoren und -Inhibitoren

Wie schon erwähnt, sind mit Ausnahme der Schweinepankreaslipase (85, 79) bisher nur Aktivitäten, aber keine einheitlichen Enzymproteine untersucht worden, so daß für die lipolytisch wirksamen Enzyme Substratspezifität sowie Aktivator- und Inhibitor-Eigenschaften noch weitgehend ungeklärt sind. Hinzu kommt, daß genauere Kenntnisse über die Vorgänge an der Öl-Wasser-Grenzfläche nicht vorliegen und die meisten Erklärungen über das Zusammenspiel zwischen Enzym-Substrat-Aktivator bzw. Inhibitor größtenteils nur Hypothesen darstellen. (79, 77, 87, 89, 90)

Dabei steht zur Diskussion, ob die aktivierende bzw. inhibierende Wirkung bestimmter Substanzen einer mehr oder weniger emulgierenden Wirkung solcher Stoffe zuzuschreiben

ist oder ob sogar ein direkter Einfluß auf das Enzym vorliegt. Benzonana und Desnuelle (106) haben die Wirkung einiger Effektoren auf die Hydrolyse langkettiger Triglyceride durch Pankreaslipase untersucht und kamen zu folgenden Ergebnissen:

1. Pankreaslipase entfaltet ihre Wirkung nur gegenüber unlöslichen in Emulsion vorliegenden Substraten. Dabei ist die Aktivität des Enzyms gegenüber einem unlöslichen emulgierten Substrat von der Größe der Phasengrenzflächen in der Emulsion abhängig, d.h. vom Emulsionsgrad.
2. In heterogenen Emulsionen wird die Aktion und Aktivität der Lipase von einer Reihe anderer Faktoren gesteuert und mitbestimmt. Benzonana u.a. (107, 108) beobachteten, daß Lipase eine Triglycerid-Emulsion, die durch Desoxycholat stabilisiert wird, erst dann angreift, wenn Ca^{++} -Salze anwesend sind. In diesem Fall soll es durch Ca^{++} zu einer Ionen-Enzymmolekül-Bindung kommen, die das Enzym erst befähigt, eine Reaktion mit der negativ geladenen Zwischenphase einzugehen.
3. Die Geschwindigkeit der Lipolyse langkettiger Triglyceride durch Lipase wird bei Anwesenheit von Natriumchlorid und anderen Salzen durch die dabei entstehenden langkettigen Seifen vermindert. Es soll dabei zu einer Anhäufung der Seifen an der Triglycerid-Wasserzwischenphase kommen, was zu einer Hemmung der Reaktion zwischen Substrat und Enzym führt, die in der Zwischenphase stattfindet.
Diese Art der Hemmung ließ sich durch Zugabe von Gallensalzen und Ca^{++} -Ionen teilweise aufheben.
4. Fernerhin wurde die Wirkung von Gallensalzen und Ca^{++} -Ionen untersucht. (108, 142) Schon in der älteren Literatur werden beide Substanzen neben Mg^{++} und Albumin als Aktivatoren bezeichnet. (109, 110)

Per definitionem darf man eine enzymatische Reaktion nur unter der Bedingung als aktiviert bezeichnen, wenn sich deren Initialgeschwindigkeit nach Zugabe eines Stoffes erhöht.

Benzonana (108) konnte nachweisen, daß schon relativ geringe Gallensalzkonzentrationen, die bei der Lipolyse entstehenden, inhibitorisch wirksamen Seifen aus der Zwischenphase durch Bildung wasserlöslicher Molekular- oder Micellarassoziationen entfernen und so eine Anhäufung von Seifen in der Zwischenphase verhindern, wo sie sich sonst normalerweise einer Adsorption der Lipase an dieser Phase entgegenstellen.

Benzonana spricht in diesem Falle nicht von einer aktivierenden Wirkung der Gallensalze, sondern von einem sogenannten desinhibitorischen Effekt.

Sobald die Gallensalzkonzentration jedoch ein gewisses Limit überschreitet, wirken die Gallensalze ebenso stark inhibitorisch wie die Seifen.

Es wird vermutet, daß Seifen wie Gallensalze durch einen sterischen oder Ladungseffekt den Zugang der Lipase zum Triglycerid-Molekül an der Zwischenphase verhindern.

Außerdem sollen sie durch Anhäufung in der Interphase diese für die Aufnahme von Lipasemolekülen blockieren, wobei sie gleichzeitig der Interphase einen polaren Charakter geben, der für eine Anlagerung von Lipase in dieser Phase sehr ungünstig ist.

Was Ca^{++} -Ionen betrifft, so sind sie in der Lage, die inhibitorische Wirkung von Gallensalzen zu verhindern. So ist z.B. die Lipase vollkommen inaktiv gegenüber einer Triglyceridemulsion, die durch Gallensalze stabilisiert ist. Sie entwickelt jedoch in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen lipolytische Aktivität.

Es konnte nachgewiesen werden, daß die aktivierende Wirkung der Ca^{++} -Ionen dadurch bedingt ist, daß sich diese Ionen an das Enzym und nicht - wie bisher vermu-

tet - an das Substrat anlagern. Andererseits soll Ca^{++} durch Erhöhung der elektrostatischen Kräfte auch eine Rolle bei der Bindung zwischen Lipase und Triglyceridmolekül spielen.

5. Desnuelle konnte weiterhin beweisen (87), daß die Pankreaslipase verhältnismäßig unempfindlich gegenüber organischen Phosphorverbindungen ist.

Diisopropylfluorophosphat zeigt sogar eine stabilisierende Wirkung, was dadurch zustande kommt, daß es die in der von Desnuelle benutzten Enzympräparation vorhandenen proteolytischen Enzyme inaktiviert.

Dagegen wirkt Diäthyl-p-Nitrophenylphosphat stark hemmend. Desnuelle und Mitarbeiter zeigen, daß dieses Phosphat in wässriger Lösung die Lipasewirkung in keiner Weise hemmt, was ein wichtiger Hinweis dafür zu sein scheint, daß es nicht nur die Substrate der Pankreaslipase sind, welche im ungelösten emulgierten Zustand mit dem Enzym in Wechselwirkung treten. (87, 88)

Nur, wenn man die Phosphorverbindung in Form einer Emulsion in Gummiarabikum zusetzt, erfolgt eine starke irreversible Hemmung des Enzyms.

6. Erst in letzter Zeit wurden noch andere antilipolytisch wirkende Stoffe bekannt. So besitzt Phenylisopropyl-Adenosin (TH 162), ein neu synthetisiertes Adenosin-Derivat, durch eine verminderte Bildung von zyklischem 3'5' AMP, welches für die Lipolyse und den Coronartonus eine biochemische Schlüsselfunktion innehat, starke antilipolytische Wirkung. (111)

TH 162 führt bei gesunden Menschen sowie bei hyperlipämischen Patienten zu einer Verminderung von nicht veresterten Fettsäuren und zu einer 50 %igen Verminderung von freiem Glycerin.

Klissiunis und Myconiatis berichten über die antilipolytische Wirkung einiger Arzneimittel. (112)

So soll Natriumnicotinat und Propanolol durch Beeinflus-

sung der hormonsensitiven Triglyceridlipase und Heparin-natrium durch Wirkung auf die Lipoproteidlipase antilipolytisch wirken, was durch Bestimmung der ungesättigten Fettsäuren des Plasmas nach Kyan und Mitarbeiter nachgewiesen wurde.

Mattson et al. (113) berichten über die hemmende Wirkung von normalen Alkoholen. Der Grad der Hemmung wächst dabei mit zunehmender Kettenlänge der Alkohole und erreicht bei Alkoholen mit 10-C-Atomen sein Maximum. Die Autoren vermuten, daß die inhibitorische Wirkung einer Adsorption des entsprechenden Alkohols an dem Substrat zuzuschreiben ist, dadurch das Enzym vom Substrat abgeblockt wird und somit seine hydrolytische Wirkung nicht entfalten kann.

Diese Vermutung wird bestärkt durch die Tatsache, daß auch eine Erhöhung der Enzymmenge zu keiner Beeinflussung der Hemmwirkung führt, wogegen sich aber das Ausmaß der Hemmung mit zunehmender Substratmenge verringert.

IV. Zusammenfassung

Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen:

1. Bei der Pankreaslipase handelt es sich wie bei den Proteasen um ein wasserlösliches Protein.
2. Pankreaslipase, Proteasen, Phospholipase und Elastase spielen eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese der akuten Pankreatitis.
3. Während Proteasen nur im homogenen System mit ihren entsprechenden Substraten bzw. Aktivatoren oder Inhibitoren reagieren, entfaltet die Pankreaslipase ihre katalytische Wirkung nur im heterogenen System; d.h. echte Lipase wirkt nur auf wasserunlösliche emulgierte Substrate, vor allem Triglyceride mit langkettigen Fettsäuren.
4. Während über die bisher in der Literatur beschriebenen Proteaseninhibitoren eine Fülle von Kenntnissen vorliegt, befindet sich das Wissen über die Natur und Wirkungsweise antilipolytisch wirksamer Stoffe noch im Dunkeln. Natürlich vorkommende Pankreaslipaseinhibitoren in Pflanzen oder Tieren sind bis jetzt nicht bekannt.

Dies scheint mehrere Gründe zu haben:

- a) Mit wenigen Ausnahmen sind bis heute Substratspezifität, Aktivator-, Inhibitor- sowie andere Eigenschaften lipolytisch wirksamer Enzyme noch weitgehend ungeklärt.
 - b) Genauere Kenntnisse über katalytische Vorgänge in heterogenen Systemen, besonders was die Vorgänge an der Öl-Wasser-Zwischenphase betrifft, liegen kaum vor.
 - c) Mitteilungen über die gegenseitige Beeinflussung von Enzym-Substrat-Aktivator-Inaktivator geben oft nur hypothetische Überlegungen wieder.
5. Auf der Suche nach einem natürlichen Inhibitor für Pankreaslipase dienen die Erkenntnisse der Proteasen-Inhibitor-Forschung als Leitfaden.

Auffallend dabei ist, daß Proteaseninhibitoren besonders

häufig in eiweißreichen Pflanzen gefunden werden.

Es war deshalb ratsam, bei der Suche nach natürlichen Inhibitoren für Lipase von fettreichen Pflanzensamen auszugehen. Fette und fettige Öle sind wasserunlösliche Substanzen. Sie stellen somit das konzentrierteste und beständigste Nährmaterial dar, das im gesamten Pflanzen- und Tierreich sehr häufig als Reservesubstanz oder für die Ernährung des Pflanzenkeimlings gespeichert wird.

Daher sind in den Pflanzen die Fette und fettigen Öle vor allem in den Samen verbreitet (z.B. von Raps, Lein, Erdnuß, Mohn, Soja, Baumwolle, Rizinus, Hanf, Kakaobohnen).

Der Fettgehalt der Pflanzensamen kann erhebliche Ausmaße erreichen. Er beträgt z.B. bei Lein 35 %, Mohn 43 %, Raps 40 %, Rizinus 33 - 43 %, Erdnuß 38 - 48 %.

Die Fette und fettigen Öle sind in den Zellen der Pflanzensamen in Form mikroskopisch kleiner Tröpfchen oder als feine im Plasma verteilte Emulsionen oder auch in Form von unregelmäßigen, festen Schollen verteilt.

Wenn die fetthaltigen Samenkörner auskeimen, wird das wasserunlösliche Fett durch Lipasen in Glyzerin und Fettsäuren gespalten.

Es ist deshalb - ausgehend von den Erkenntnissen der Proteasen-Inhibitor-Forschung - auch für fettreiche Pflanzensamen ein Schutzsystem zu erwarten, das den Pflanzensamen in der Ruhepause vor der Auskeimungsperiode vor vorzeitigem unphysiologischem Abbau der Fette schützt.

EXPERIMENTELLER TEIL

C) MATERIAL UND METHODEN

I. Material

1. Enzym : Lipase (E.C. 3.1.1.3.) aus Schweinepankreas, Serva

Aktivität : 1 mg spaltet bei pH 7.4 und 37° C pro Stunde
15 - 20 µval Essigsäure aus Triacetin oder
75 - 125 µval Ölsäure aus Olivenöl.

Es handelt sich um eine "echte" Lipase, die nur an der Oberfläche emulgierter Öle in Aktion tritt, im Gemisch mit ca. 20 % Esterase, etwas Diastase und Protease

2. Substrat : Olivenöl (oleum olivae neutralisatum sterilisatum), Ph. H.V., Siegfried, Zofingen

3. Reagenzien: Gummi arabicum, ausgelesen, feingepulvert, D.A.B. 7, MERCK
Tymolphthalein - Indikator $C_{28}H_{30}O_4$ MG 430 farblos blau, MERCK
Lauf- und Fließmittel: alle p.A., MERCK
1 N Natronlauge, Titrisol, MERCK
2'7' Dichlorfluoreszenz Sprühreagenz 0,1 % für Chromatographie, MERCK

Anderes

Material : D.C.-Alufolien für Dünnschicht-Chromatographie
MERCK

Kieselgel 60 F 254

25 Folien 20 x 20 cm

Schichtdicke 0,25 µm

Kieselgel G 60 für Säulenchromatographie

Korngröße: 0,063 - 0,200 μm

(70 - 230 mesh ASTM)

Apparate : Auf 37° C thermostatisiertes Wasserbad

Firma: LAUDA

Magnetrührer: IKA-Combimag-MCO mit mechanischer Drehzahlregelung

Fraktomat Y 3 - Firma: HAKO

Ultra Turax

Glaswaren : 5 x 100 cm-Säule mit Glasfritte, Teflonhahn mit Olive

5 x 30 cm-Säule mit Glasfritte, Teflonhahn mit Olive

Erlenmeyerkolben à 100 ccm

10 ml Glasbürette mit einer Ablesegenauigkeit von 0,01 ml und 2 l-Vorratsbehälter

1, 2, 5, 10, 20 ml Stabpipetten

4. Herstellung der Gebrauchslösungen

Enzym:

10 mg Enzym werden in 10 ml aqua bidest. gelöst. ph 8 Lösung muß für jeden Testansatz neu zubereitet werden.

Tris-Puffer:

50 mM; ph 8,0

6,057 g Tris in 900 ml aqua bidest. lösen,

ph mit 1-n Salzsäure auf 8.0 einstellen und mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Natronlauge (0,05 n):

genau 50 ml 1-n-Natronlauge (Titrisol, MERCK) im Meßkolben mit aqua bidest. auf 1000 ml verdünnen.

Thymolphthalein-Stammlösung: 2 %ig:

5 g Thymolphthalein mit 96 %igem Äthanol p.A. MERCK auf 250 ml lösen.

Thymolphthalein-Gebrauchslösung:

40 ml Stammlösung und 500 ml 96 %iges Äthanol sind gut zu mischen. Lösung ist gut verschlossen unbeschränkt haltbar.

Oliven-Emulsion:

Mit Hilfe eines Mixers werden bei kleinerer Geschwindigkeit 1 g Natrium benzoicum und 37 g Gummi arabicum in 500 ml aqua bidest. gut gelöst bzw. emulgiert.

Bei weiterhin kleinerer Geschwindigkeit langsam 500 ml Olivenöl (oleum olivae neutralisatum sterilisatum) zugießen, anschließend 5 Minuten weiterrühren und den Mixer dann 5 Minuten mit hoher Geschwindigkeit laufen lassen.

Substrat-Puffer-Gebrauchslösung:

1 Teil Olivenölemulsion plus 1 Teil Trispuffer über Magnet-rührer miteinander mischen.

Diese Gebrauchslösung wurde täglich frisch hergestellt und vor Gebrauch über den Magnet-rührer während einiger Minuten sehr gut gemischt.

5. Zubereitung der Lipidinhibitor-Emulsion

Von den auf Hemmwirkung zu prüfenden Lipiden und Lipidfraktionen werden ebenfalls Emulsionen hergestellt. Dabei wird folgendermaßen vorgegangen:

- a) Die auf Hemmwirkung zu prüfenden Lipide bzw. Lipidfraktionen liegen jeweils in 50 ml Petroläther/Diäthyläther 9 : 1 gelöst vor.
- b) Zur Bestimmung der Hemmaktivität entnimmt man einer solchen Portion eine bestimmte Menge (zwischen 1 und 10 ml)

und entfernt das Lösungsmittel dieses Anteils im Vakuum.

c) Herstellung einer Gummi-arabicum-Lösung:

3,7 g G.a./50 ml aqua dest. 3 Min. mit Hilfe eines Ultra-Turax homogenisieren.

d) Lösungsmittelfreies Lipid und 50 ml Gummi-arabicum-Lösung werden vereinigt und mit Hilfe eines Ultra-Turax intensiv homogenisiert. Diese Lipid-Emulsion wird zur Bestimmung des Lipid-Leerwertes und zum Nachweis antilipolytischer Aktivität benutzt.

II. Methodik

1. Testverfahren zum Nachweis antilipolytischer Aktivität

1.1 Prinzip

Methode der Wahl ist die Laugentitration der freiwerdenden Wasserstoffionen, die den enzymatisch freigesetzten Fettsäuren äquivalent sind.

Dabei wird Lipase mit einer Olivenöl-Emulsion während 30 Min. bei 37° C und pH 8 inkubiert und die Menge der durch die Lipaseaktivität freigesetzten Fettsäuren mit Natronlauge titrimetrisch bestimmt.

1.2 Verfahren

Durch geeignete Modifikation der Methode von Tietz und Weber (76, 86) zur Bestimmung der Serumlipase-Aktivität ist es gelungen, ein sehr einfaches und schnelles Verfahren zum Nachweis antilipolytischer Aktivität zu entwickeln.

Dazu bedarf es der Bestimmung folgender vier Titrationsansätze:

1. Substratleerwert	10 ml Substrat-Puffer-Gebrauchslösung 1 ml Thymolphthalein
2. Lipidleerwert	10 ml Lipid-Puffer-Emulsion 1 ml Thymolphthalein
3. Lipasevergleichswert	2 mg Enzym / 2ml aqua bidest. 10 ml Substrat-Puffer-Gebrauchslösung 0,1 - 10 ml Emulsionszusatz 1 ml Thymolphthalein unmittelbar vor der Titration

- | | |
|---------------|---|
| 4. Hemmansatz | 2 mg Lipase / 2 ml aqua bidest. |
| | 0,1 - 10 ml Lipid-Puffer-Emulsion |
| | 15 Min. Inkubation |
| | 10 ml Substrat-Puffer-Gebrauchs-
lösung |
| | 1 ml Thymolphthalein unmittel-
bar vor der Titration |

Alle vier Titrationsansätze werden über einen Magnetrührer 30 Sekunden gemischt, sodann im Wasserbad 30 Min. bei 37° C inkubiert.

Danach werden die in den Ansätzen 1 und 2 (sogenannte Leerwertansätze) befindlichen sauren Valenzen und die in den Ansätzen 3 und 4 (sogenannte Analysenansätze) während der Inkubationszeit freigesetzten Fettsäuren bis zum Auftreten einer eindeutig hellblauen Farbe mit 0,05 n NaOH mit Hilfe einer Bürette titriert.

1.3 Auswertung

Der Nachweis antilipolytischer Aktivität geschieht nach folgenden Auswertungsverfahren:

- | | |
|------------------------|------------------------------------|
| I. reine Lipasewirkung | - Titrationsansatz 3 minus 1 |
| II. Hemmwirkung | - Titrationsansatz 4 minus (1 + 2) |

Hemmwirkung ist vorhanden, wenn $I > II$.

Durch die eingesetzte Lipidmenge erzielbare Hemmung in %:

$$\% = 100 - 100 \times II/I$$

1.4 Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Methode

Genauigkeit

Die Genauigkeit der Bestimmung antilipolytischer Aktivität konnte durch folgende Punkte erhöht werden:

1. durch Leerwertsbestimmungen der Substrat- und Inhibitor-Emulsion bei jedem neu angesetzten Test.
Beide Emulsionen können titrierbare Acidität besitzen und stellen deshalb ohne deren Vorbestimmung eine Fehlerquelle dar.
2. durch Doppelbestimmung eines jeden Testansatzes.
3. Titration der Testansätze über ein Magnetrührwerk führt zur sofortigen Durchmischung des Analysengutes mit der Titrierlauge und dadurch zur sehr genauen Festlegung des Umschlagpunktes.
Außerdem wird die Titrationszeit dadurch stark verkürzt.
4. Exakte Titration mit einer Bürette bei einer Ablesungsgenauigkeit von 0,01 ml.
5. Schaffung optimaler Reaktionsbedingungen
ph Optimum: bei ph 8 liegt ein eindeutiges Optimum der Enzymaktivität vor. (85)

Zuverlässigkeit

Spezifität und Empfindlichkeit

O Olivenöl gilt allgemein als äußerst empfindliches und spezifisches Substrat für die Bestimmung der Pankreaslipase. Es wird von Esterasen und Lipasen anderer Herkunft nicht hydrolysiert. (78, 79, 85, 89, 93)

Da die wirksame Substratkonzentration abhängig von der Öl-Wasser-Grenzfläche ist, wurde als Substrat eine über den Testzeitraum stets vorher neu angefertigte Emulsion eingesetzt.

Als Schutzkolloid für die Emulsion wurde Gummi arabicum verwendet. (85)

2. Grundlagen des neuen Verfahrens zur Isolierung eines Lipase-hemmstoffes aus Lipiden von Arachis hypogaea

2.1 Lipidextraktion

Sowohl als Ausgangspunkt für die Isolierung bestimmter Lipide als auch als erster Schritt für quantitative Lipidbestimmungen ist ihre Extraktion aus den Pflanzensamen von *Arachis hypogaea* und die Abtrennung störender Beimengen notwendig. Zur Gewinnung eines Gesamtlipidextraktes werden dazu je 500 g gemahlene Erdnüsse mit 5 l Aceton, zum anderen mit 5 l Chloroform-Methanol-Lösung 2:1/v/v 5 Stunden bei 5° C intensiv gerührt.

Das Chloroform-Methanolgemisch soll den Vorteil haben, dank eines hydrophilen als auch lipophilen Anteils die in vielen Geweben vorliegenden Lipideiweißbindungen zerstören und somit eine Vollständigkeit der Extraktion garantieren zu können.

Der auf diese Weise gewonnene Aceton- bzw. Chloroform-Methanol-Gesamtlipidextrakt wird durch Vakuumfiltration von festen Partikeln befreit. Der Niederschlag auf dem Filter wird gründlich mit Lösungsmittel nachgewaschen. Das Lösungsmittel des Gesamtlipidextraktes wird anschließend im Vakuum entfernt. Ein Teil des lösungsmittelfreien Lipidgesamtextraktes wird nach Emulgierung zum Nachweis antilipolytischer Aktivität benutzt.

2.2 Grundlagen der Chromatographie

Als Chromatographie bezeichnet man ein Verfahren, bei dem eine Lösung zu trennender Substanzen über ein festes, unlösliches, anorganisches oder organisches Material, das in mehr oder weniger fein verteilter Form vorliegt, in einer durch eine apparative Anordnung vorgegebenen Richtung strömt, wobei die Komponenten in individuell verschiedenem Ausmaß

zurückgehalten werden. (120, 121)

Als zugrunde liegende Mechanismen kommen Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen sowie reversible Bindung der wandernden Substanzen an die Oberfläche des Adsorbens in Frage.

Handelt es sich im letzteren Falle vorwiegend um physikalische Oberflächenkräfte, so spricht man von Adsorptions- oder nach ihrem Entdecker von Tswett-Chromatographie.

(119)

Die Adsorptions-Chromatographie ist in erster Linie für die Trennung lipophiler Stoffe geeignet.

1941 führten Martin und Synge (122) die Verteilungs-Chromatographie ein. Sie verwendeten Säulen aus Kieselgel, das mit einer bestimmten Menge Wasser beladen war. Die Verbindungen wurden wie bei der Adsorptions-Chromatographie auf den obersten Abschnitt der Säule aufgebracht und dann mit passenden organischen Lösungsmitteln "entwickelt". Die "mobile" organische Phase transportiert die Stoffe über die "stationäre" wässrige Phase. Hierbei werden die transportierten Stoffe zwischen den beiden Phasen verteilt. Voraussetzung hierfür ist, daß die Stoffe eine gewisse Wasserlöslichkeit besitzen. Sind ihre Verteilungskoeffizienten genügend verschieden, so wandern sie verschieden weit und werden voneinander getrennt eluiert.

In der Praxis handelt es sich meist um eine Kombination von Adsorptions- und Verteilungs-Chromatographie, wobei der eine oder andere Typ mehr oder weniger stark dominiert.

Als ein allgemein anwendbares Verfahren der analytischen Adsorptionschromatographie wurde durch Stahl 1956 die Dünnschichtchromatographie (= D.C.) eingeführt. (121, 123 - 125) Die D.C. wird auch als "Chromatographie an der offenen Säule" bezeichnet. Es werden in der Regel die gleichen Typen von

Sorptionsmitteln wie in der S.C. angewendet.

Besondere Vorteile der D.C. sind:

1. Der apparative Aufwand ist gering.
2. Sehr geringer Zeitaufwand, der für eine Trennung auf anorganischen Sorptionsmittelschichten weit weniger als eine Stunde beträgt.
3. Äußerste Trennschärfe. Die erzielten Trenneffekte sind den mit der Papierchromatographie erreichbaren überlegen.
4. Die untere Erfassungsgrenze der zu identifizierenden Substanzen liegt bei der D.C. um eine Zehnerpotenz unter der der Papierchromatographie.
5. Selbst mit kleinsten Substanzmengen lassen sich noch gut erkennbare Trennungen durchführen.
6. Die in der D.C. bevorzugte Anwendung anorganischer Sorbentien als Schichtmaterial gestattet den Nachweis der aufgetrennten Substanzen selbst mit aggressiven Sprühmitteln.
Als weiterer Vorteil kommt die geringe Eigenfluoreszenz anorganischer Sorbentien hinzu, was den Nachweis von Substanzen durch Betrachtung im UV-Licht begünstigt.
7. Die in der dünnenschichtchromatographischen Analyse angewandte Arbeitsmethode läßt sich auf Trennungen im präparativen Maßstab mit Hilfe dickerer Schichten übertragen, desgleichen auch in den meisten Fällen auf s.c. Trennmaßstab.
8. Die D.C. ist besonders bei der Trennung lipophiler Stoffe wirksam.

Zusammenfassend läßt sich sagen:

Säulenchromatographie und Dünnenschichtchromatographie werden wegen ihrer hervorragenden Eigenschaften bei der Trennung lipophiler Stoffgemische zur Grundlage eines neuen Verfahrens zur Isolierung eines Lipasehemmstoffes aus *Arachis hypogaea*.

2.2.1 Technik der Säulenchromatographie

Zur Orientierung soll eine kurze Einführung in die Technik der Säulenchromatographie gegeben werden, wie sie bei den Versuchen zu dieser Arbeit gehandhabt wurde.

Reagenzien:

- Kieselgel G 60, für die Säulenchromatographie - MERCK
- Petroläther Kp 40 - 60° C redest, MERCK
- Diäthyläther, puriss., peroxydfrei, absolut
- Eisessig p.A., MERCK

Glaswaren:

- Säulen mit Porzellan-Fritte und Teflon-Auslaufhahn:
5 x 100 cm und 5 x 30 cm

Durchführung:

Kieselgel wird mit Petroläther/Diäthyläther/Eisessig 9 : 1 : 0,1 äquibriert und in eine Glassäule von 5 x 30 bzw. 5 x 100 cm eingefüllt. Beide Säulen bleiben über Nacht stehen. Auf diese Weise wird die Füllung kompakt. Vor Auftragen der Substanzen werden 2 - 3 l des zur Elution benutzten Fließmittels durch die Säule laufen gelassen.

Auftragen der Substanz:

Nachdem die Säule mit Petroläther/Diäthyläther/Eisessig durchgewaschen ist, gibt man bei geschlossenem Auslaufhahn 30 g des extraktionsmittelfreien Gesamtlipids gelöst in 40 ml Petroläther/Diäthyläther mit Hilfe einer Pipette gleichmäßig verteilt auf die Säulenoberfläche, die durch ein kreisrundes Filterpapier abgedeckt ist. Sodann läßt man durch Öffnen des Teflon-Auslaufhahnes

das Lipidgemisch in das Kieselgel einsickern und spült mit zwei weiteren Petroläther/Diäthyläther/Eisessig-Portionen zugleich das Aufbewahrungsgefäß des Lipids, die Pipette und die Säulenwandung oberhalb der Füllung aus, wobei das Lösungsmittel jeweils wieder vollständig bis zur Säulenoberfläche abgelassen wird. Erst dann wird aus einem Vorratsbehälter das Elutionsmittel zugelassen.

Eluierung der Komponenten:

Zur möglichst vollständigen Auftrennung der Lipide aus *Arachis hypogaea* wird nach einem unten aufgezeigten Elutionsschema vorgegangen. Auf eine scharfe Grenze zwischen dem Elutionsmittel kann man verzichten und bei Lösungsmittelwechsel im Chromatographierohr oberhalb der Säule das vorangehende Lösungsmittel stehen lassen. Das Eluat wird vorteilhafterweise mit einem Fraktionssammler in 15 ml-Mengen aufgefangen.

Dünnschicht-chromatographisch kann man die darin enthaltenen Komponenten näher bestimmen und Komponenten mit gleichen R_F -Werten vereinigen.

2.2.2 Technik der Dünnschichtchromatographie (= D.C.)

Einführung:

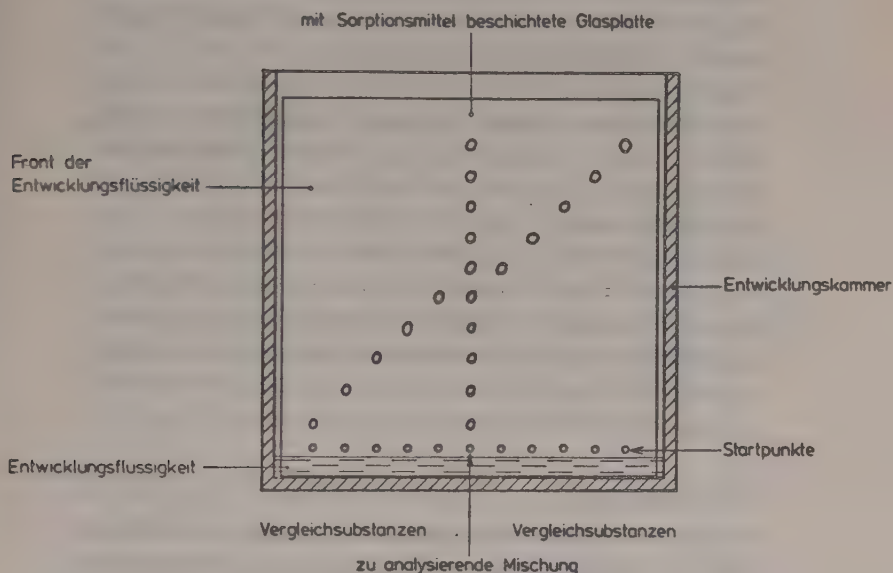
Zur Trennung kleinster Substanzmengen hat sich die dünn-schichtchromatographische (d.c.) Analyse nach der durch Stahl erfolgten Standardisierung des Verfahrens sehr gut bewährt. (120, 121)

Prinzip:

Auf dünnen Sorptionsmittelschichten werden punktförmig aufgetragene Lösungen von Substanzgemischen mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln entwickelt. Die getrennten Substanzen werden durch Betrachten im UV-Licht oder

Besprühen mit charakteristischen Nachweisreagenzien sichtbar gemacht, wobei mit Hilfe entsprechender Vergleichssubstanzen oft die Identifizierung erleichtert wird.

Schema einer d.c. Trennung:



Beschichten der Platten:

Viele Sorptionsmittel und Trägermaterialien sind heute schon in Form von vorgefertigten Schichten auf Glas- oder Alufolienunterlagen erhältlich. (120, 121, 126)

Bei dieser Arbeit werden sowohl vorgefertigte Schichten auf Alufolien als auch selbst angefertigte Schichten benutzt. Es soll deshalb kurz die Selbstbereitung der Schichten skizziert werden.

Die gebräuchlichste Schichtunterlage ist Glas. Die Beschich-

tung der Glasplatte erfolgt nach Herstellung einer meist wässerigen Suspension des Sorptionsmittels, am besten mit Hilfe eines Streichgerätes der Firma Desaga GmbH, Heidelberg. (120, 121, 127)

Es wird auf quadratischen Glasplatten von 20 cm Kantenlänge gearbeitet. Wichtig ist, daß die Platten vor der Benutzung gründlich gereinigt werden (durch Abspülen mit Wasser und Nachbehandlung mit Aceton und anschließender Spülung in destilliertem Wasser).

5 quadratische Platten werden in eine Schablone eingelegt. Bei diesen Schablonen müssen an den Anfang und an das Ende zwei 5 cm breite Glasplatten eingefügt werden, auf die das Streichgerät zu Beginn aufgesetzt und nach dem Aufstreichen abgesetzt wird.

Nach dem Aufsetzen des Streichgerätes füllt man die Suspension des Sorptionsmittels ein und streicht zügig über die Platten aus. Die bei den anorganischen Sorptionsmitteln empfohlene Einstellung des Streichgerätes auf eine Schichtdicke von 300 μ ergibt nach Trocknung gemessene Schichtdicken von 250 μ .

Sorptionsmittel:

Ausgehend von den Erfahrungen mehrerer Autoren (120, 121, 128, 129, 130) bei der Trennung lipophiler Stoffgemische verwenden wir bei dieser Arbeit nur mit Kieselgel G bzw. GF 254 beschichtete Platten für die D.C. und mit Kieselgel G gefüllte Säulen für die Säulenchromatographie.

Eigenschaften:

Kieselgel G (Siliciumdioxid) enthält 15 % Gips als Bindemittel.

Kieselgel GF 254 nach Stahl enthält Gips als Bindemittel sowie einen anorganischen Fluoreszenzindikator, der bei der Anregungswellenlänge 254 $m\mu$ fluoresziert.

Für die Zubereitung der Sorptionsmittelschichten werden zum Beschichten von je 5 Platten 20 x 20 cm 30 g Sorptionsmittel (Kieselgel G bzw. GF 254) mit ca. 70 ml destilliertem Wasser durch Anschütteln in einem Glaskolben intensiv gemischt. Die zunächst dünnflüssige Masse verfestigt sich innerhalb weniger Minuten; sie muß daher umgehend in das Streichgerät, das auf eine Schichtdicke von 300 μ eingestellt ist, gefüllt und in einem Zug gleichmäßig auf die Glasplatten aufgetragen werden. Die Abbindezeit beträgt 3 - 4 Minuten. Innerhalb dieser Zeit sollen die Vorgänge vom ersten Wasserzusatz bis zum Ausstreichen beendet sein.

Bis zum vollständigen Abbinden der Schicht - etwa 30 Minuten - werden die Platten auf dem Beschichtungsgerät belassen. Die luftgetrockneten Platten können im Trockenschrank aktiviert werden (30 Minuten bei max. 105° C).

Zur Aufbewahrung werden die fertigen Platten mit der Schicht nach oben in die Führungsschiene eines Trockengestells geschoben und so bis zur Benutzung in einen vorgeheizten Trockenschrank gegeben.

Auftropfen der Substanzlösungen:

Zur Durchführung der d.c. Analyse werden 0,01 bis 1 %ige Lösungen der Untersuchungssubstanz aufgetragen. Als Lösungsmittel wird Petroläther Kp 40 - 60° C, p.A. MERCK, und Diäthyläther, p.A. MERCK (v/v/9 : 1), verwendet. Die Untersuchungslösung wird in mehreren kleinen Anteilen nacheinander auf die Platte gebracht und vor erneutem Auftragen jeweils mit Hilfe eines Föns getrocknet. Damit wird erreicht, daß die Substanz am Startpunkt auf kleinstem Raum zusammenbleibt, was für den Trenneffekt wichtig ist. Das Aufsetzen der Tropfen erfolgt mit einem Kapillarröhrchen etwa 1,5 cm vom unteren Plattenrand entfernt. Die Tropfpunkte, auch Startpunkte genannt, sind ca. 2 cm voneinander entfernt. Es werden ca. 10 - 20 μ l

aufgetragen. Mit Hilfe eines Bleistiftes können die Startpunkte vormarkiert werden.

Laufmittel:

Bei der Chromatographie haben wir es mit einem System aus drei Komponenten zu tun: Adsorbens, chromatographierte Verbindung und Laufmittel.

Es werden deshalb zur Ermittlung der günstigen Trennbedingungen bzw. des optimalen Laufmittels d.c. Vorversuche mit verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen durchgeführt.

Orientierende Hilfen bei der Auswahl der Laufmittel geben die von verschiedenen Autoren mitgeteilten "eluotropen Reihen". Darin sind die Laufmittel bzw. Mehrkomponentenlaufmittel nach steigender Elutionswirkung geordnet. Es werden nur reinste Lösungsmittel verwendet. Da die meisten pflanzlichen Lipidgemische freie Fettsäuren enthalten, ist es ratsam, die Fließmittel mit einem Zusatz von 1 - 2 % Eisessig zu verwenden, um einer Dimerisierung von Fettsäuren, die sich d.c. durch Schwanzbildung hervortun, zu vermeiden.

Entwickeln:

Zur Entwicklung der Dünnschichtplatten stellt man eine oder zwei Platten in einen Glastrog mit geschliffenem Glasdeckel ein, dessen Boden 5 - 10 mm hoch mit einem Laufmittel bedeckt ist. Um bei der Entwicklung der Platten sogenannte Randphänomene (120) zu vermeiden - bei dieser Erscheinung liegen die Zonen gleichartiger Substanzen nicht in einer Höhe, sondern die R_F -Werte, das Verhältnis der Wanderungsstrecke der Substanz zur Wanderungsstrecke des Laufmittels (messen vom Startpunkt), nehmen von der Mitte nach den beiden Rändern hin stetig zu -, werden an die Kammerwände mit Laufmittel getränkte Filterpapiere ausge-

legt. Diese Technik hat auch den Vorteil, daß sich die Laufzeit um etwa $\frac{1}{3}$ verkürzt. Sobald die Lösungsmittelfront die verlangte Höhe (16,5 cm vom Startpunkt) erreicht hat, werden die Platten aus der Kammer herausgenommen und mit einem Fön getrocknet.

Nachweis der getrennten Substanzen:

Die Platten werden nach der Herausnahme aus der Kammer zunächst getrocknet. Durch geeignete Nachweisreagenzien werden die getrennten Substanzen sichtbar gemacht. Dazu werden die Chromatogramme mit einer 0,1 %igen äthanolischen 2'7' Dichlorfluoreszeinlösung besprüht. Mit diesem Reagenz sind fast alle Lipide als hellgrüne fluoreszierende Flecken im UV-Licht (270 m μ) sichtbar. Ebenfalls gute Erfahrungen werden mit einer 0,25 %igen Lösung von Rhodamin B in 96 %igem Äthanol gemacht. Hierbei sind die Lipidkomponenten als blauviolette Flecke auf rotem Grund sichtbar. Beide Sprühreagenzien werden in gebrauchsfertiger Form in praktischen Aerosol-Sprühdosen von Merck geliefert.

Qualitative Auswertung der Chromatogramme

Auf dem fertigen Chromatogramm werden die Flecken mit einem spitzen Bleistift umpunktet, die Mittelpunkte markiert und deren Abstände zur Startlinie gemessen. Der Quotient der Abstände (Fleck - Start) und (Front - Start) ergibt den R_F -Wert.

Dabei wird stets der Mittelwert aus einer Reihe gleichartiger Bestimmungen angegeben.

$$R_F\text{-Wert} = \frac{\text{Entfernung der Substanz vom Startpunkt}}{\text{Entfernung der Laufmittelfront vom Start}}$$

Was die Reproduzierbarkeit der R_F -Werte anbelangt, so

ist sie von mehreren Faktoren abhängig, die beachtet werden müssen:

1. Qualität des Schichtmaterials
2. Aktivierungsgrad der Schicht
3. Luftfeuchtigkeit
4. Schichtdicke
5. Qualität des Laufmittels
6. Sättigung der Trennkammer
7. Substanzmenge
8. Temperatur

Dokumentation der D.C.-Chromatogramme

Zur Dokumentation der Chromatogramme werden einfache Abzeichnungen mit Hilfe von Transparentpapier vorgenommen.

2.2.3 Prinzip der Gaschromatographie

Mit der Entwicklung der Gaschromatographie wurde dem Analytiker eine Methode zur Trennung gasförmiger bzw. verdampfbarer Substanzen an die Hand gegeben, deren Trennwirksamkeit, Schnelligkeit und Empfindlichkeit besonders hervorzuheben sind.

Das Prinzip der Trennung entspricht dem der bekannten chromatographischen Methoden.

In der "Gas-Adsorptions-Chromatographie" sind die Trennsäulen mit festen aktiven Adsorbentien gefüllt.

In der "Gas-Verteilungs-Chromatographie" wird mit einer flüssigen stationären Phase gearbeitet, die in dünner Schicht auf ein inertes Trägermaterial aufgebracht wird. Die mobile Phase ist in jedem Fall ein Gas. Das zu prüfende Gemisch wird mittels einer Dosiervorrichtung auf die Säule gegeben, bei konstanter oder - im Falle der sog. temperaturprogrammierten Gaschromatographie - kontinuierlicher erhöhter Temperatur verdampft und die Gas-

phase mit Hilfe eines inerten Trägergases durch die Säule gegeben. Die einzelnen Fraktionen treten zusammen mit dem Trägergas hintereinander aus der Säule aus, werden durch geeignete Meßvorrichtungen (z.B. Wärmeleitfähigkeits- oder Flammenionisationsdetektoren) kenntlich gemacht und im allgemeinen automatisch registriert. Die vom Schreibgerät aufgezeichnete Kurve dient sowohl zur Ermittlung der Konzentration der einzelnen Fraktionen als auch der qualitativen Zusammensetzung des Prüfgemisches.

Eine ins einzelne gehende Erläuterung der Gaschromatographie sowie der zur Anwendung kommenden Geräte würde über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen. Es sei deshalb auf Darstellungen in der wissenschaftlichen Literatur hingewiesen. (131 - 136)

D) EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

Beschreibung und Diskussion der einzelnen Schritte des Isolierungs- und Charakterisierungsverfahrens für einen Lipasehemmstoff aus Lipiden von *Arachis hypogaeae*

I. Isolierungsverfahren

1. Schritt: Fettreiche Pflanzensamen homogenisieren, Lipidextrakte herstellen, anschließend diese nach Emulgierung auf Antilipasewirkung testen.

Ausgehend von der Überlegung, daß Proteasen-Inhibitoren in hohen Konzentrationen bevorzugt in eiweißreichen Pflanzensamen gefunden werden, ist zu erwarten, daß in fettreichen Pflanzensamen, in denen Lipide als Hauptvorratsstoffe gespeichert sind, ein Schutzsystem vorhanden sein muß, das die Lipide vor vorzeitigem Abbau durch lipolytisch wirksame Enzyme schützt. Von dieser Feststellung ausgehend, werden nach Homogenisierung mehrerer fettreicher Pflanzensamen Lipidextrakte aus diesen Samen gewonnen und auf das Vorhandensein eines antilipolytisch wirkenden Systems geprüft.

Lipidproben für Suchteste auf Inhibitorgehalt werden aus folgenden Pflanzensamen gewonnen:

Erdnuß
Mohn
Mais
Raps
Pignoliën
Sojabohnen
Rizinus

Homogenisierung und Lipidextraktion

Die Lipide der zur Untersuchung ausgewählten Pflanzensamen erhält man durch Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel aus den fein gemahlenden Kernen. Dazu werden jeweils 100 g der mit Hilfe einer Mohnmühle feinstens homogenisierten Pflanzensamen mit 1 l Aceton 5 Stunden bei 4° C intensiv gerührt. Die so gewonnenen Gesamtlipidextrakte werden durch Filtrieren im Vakuum von festen Partikeln befreit, anschließend das Lösungsmittel im Vakuumrotationsverdampfer restlos entfernt. Danach werden die lösungsmittelfreien Gesamtlipidextrakte mit 100 ml Petroläther/Diäthyläther (P/D, v/v 9 : 1) versetzt und dienen in dieser gelösten Form als Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen.

Testung der Gesamtlipidextrakte auf Antilipasewirkung

Aliquote Mengen - 10 ml - eines jeden in 100 ml P/D-Lösung vorliegenden Gesamtlipidextraktes werden entnommen, in 100 ml-Kolben gefüllt, Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die im Kolben verbleibenden Lipide, wie unter "Material und Methoden" bereits eingehend beschrieben, mit Hilfe einer Gummi-arabicum-Lösung (3,5 g G.arab./50 ml Aq.bid.) und eines Ultra-Turax-Mixers emulgiert.

Jeweils 10 ml einer solchen auf Antilipasewirkung zu prüfenden Lipidemulsion werden zur Leerwertsbestimmung benutzt bzw. dem Heumansatz zugefügt.

Titrationsansätze

- | | |
|---------------------|--|
| 1. Substratleerwert | 10 ml Substratpuffer-Gebrauchslösung
1 ml Thymolphthalein |
| 2. Lipidleerwert | 10 ml Lipidemulsion
1 ml Thymolphthalein |

- | | |
|-------------------------|---|
| 3. Lipasevergleichswert | 2 mg Enzym / 2 ml Aqua bidest.
10 ml Substratpuffer-Gebrauchslösung
1 ml Thymolphthalein unmittelbar
nach Inkubation bzw. vor der
Titration |
| 4. Hemmansatz | 2 mg Lipase / 2 ml Aqua bidest.
10 ml Lipidemulsion
15 Min.: Vorinkubation
10 ml Substratpuffer-Gebrauchslösung
1 ml Thymolphthalein unmittelbar
nach Inkubation bzw. vor der
Titration |

Nach 30-minütiger Inkubation werden einmal die schon von vornherein in der Substrat- und Lipidemulsion vorhandene Acidität, zum andern die durch das Enzym in den Ansätzen 3 und 4 zusätzlich freigesetzten Fettsäuren mit 0,05 nNaOH bis zum Auftreten einer hellblauen Farbe titriert.

Auswertung

Am Beispiel eines Hemmtests mit 10 ml Erdnuß-Lipidemulsion soll das Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins antilipolytischer Aktivität erklärt werden.

Ergebnisse der Titrationsansätze

- | | |
|----------------------------|---|
| 1. Substratleerwert | 4,30 ml verbrauchte 0,05 n NaOH |
| 2. Erdnußemulsionsleerwert | 1,5 ml verbrauchte 0,05 n NaOH pro
10,0 ml Erdnuß-Lipidemulsion |
| 3. Lipasevergleichswert | 6,80 ml verbrauchte 0,05 n NaOH |
| 4. Hemmansatz | 6,60 ml verbrauchte 0,05 n NaOH pro
10,0 ml Erdnuß-Lipidemulsion |

Ausrechnungsverfahren

I = reine Lipasewirkung = Titrationsansatz 3 minus 2
II = Hemmwirkung = Titrationsansatz 4 minus (1 + 2)

Hemmwirkung ist vorhanden, wenn I > II.

Durch die eingesetzte Lipidmenge erzielbare Hemmung in %:

$$= 100 - 100 \times \frac{II}{I}$$

I reine Lipasewirkung : 6,80 - 4,30
= 2,50 ml verbr. 0,05 n NaOH
II Hemmwirkung : 6,60 - (4,30 + 1,50)
= 0,80 ml verbr. 0,05 n NaOH

$$\text{Erzielte Hemmung in \%} = 100 - 100 \times \frac{0,8}{2,5} = 68 \%$$

Nach diesem Verfahren werden auch aliquote Mengen der Gesamtlipidextrakte, die aus den übrigen zur Untersuchung benutzten Pflanzensamen gewonnen worden sind, auf Antilipasewirkung getestet. Unten stehende Tabelle gibt die mit den einzelnen Lipidextrakten erzielten Hemmungen der echten Lipaseaktivität in % wieder:

Übersicht über inhibitorische Leistung der untersuchten Gesamtlipidextrakte aus mehreren Pflanzensamen

<u>Pflanzensamen:</u>	<u>Hemmung in %:</u>
Erdnuß	68
Mohn	70
Raps	50
Mais	5
Pignolien	5
Sojabohnen	80
Rizinus	82

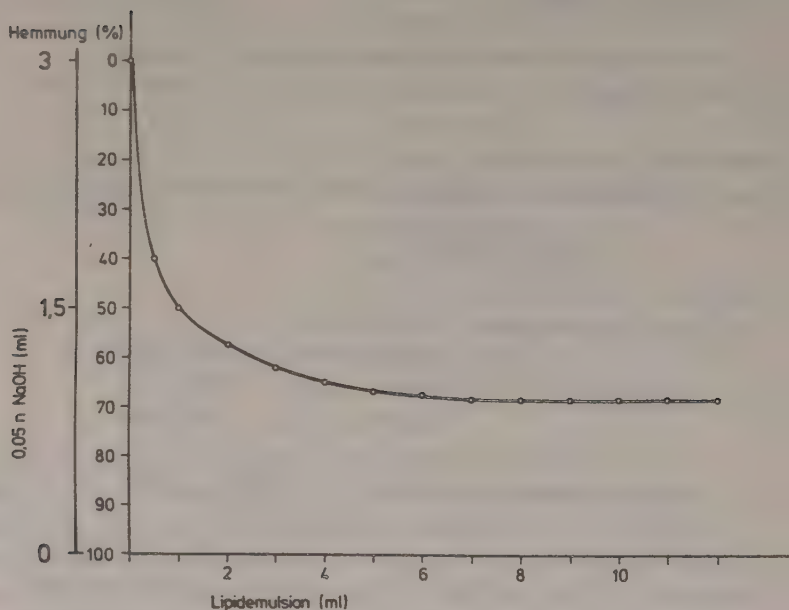


Abb. 1 Hemmung der Lipaseaktivität durch Lipide des Gesamtlipidextraktes aus *Arachis hypogaea*.

Im Ansatz freigesetzte Fettsäuren (= Verbrauch an 0,05 n NaOH) mit steigenden Mengen an zugesetztem Hemmstoffhomogenat.

Diskussion

Nach Untersuchung mehrerer Gesamtlipidextrakte aus verschiedenen fettreichen Pflanzensamen auf antilipolytische Wirkung muß vermutet werden, daß fettreiche Pflanzensamen ein antilipolytisch wirksames System besitzen.

Im folgenden soll nun der Gesamtlipidextrakt aus *Arachis hypogaea* zur Charakterisierung und Isolierung des Hemmstoffes näher untersucht werden.

2. Schritt: Erstellung einer Hemmkurve und Untersuchungen zur Charakterisierung des Hemmverhaltens.

Wie im vorangegangenen Schritt bereits beschrieben, vermag eine definierte Menge eines Gesamtlipidextraktes aus *Arachis hypogaea* die enzymatische Aktivität von Schweinepankreaslipase zu hemmen.

Zur Untersuchung des linearen Zusammenhangs zwischen dem Ausmaß der Hemmung der Lipaseaktivität und der Konzentration an Lipidinhibitor wird eine definierte Menge Lipase vorgelegt und nach Zugabe variierender Lipidmengen (Abszisse) die bei der Titration mehr oder weniger verbrauchte Menge Natrum-lauge gemessen (Ordinate), die ein indirekter Maßstab für die verbleibende Restaktivität des Enzyms darstellt. (Abb. 1)

Charakterisierung des Hemmverhaltens

Die Enzymhemmung ist eine Sofortreaktion, denn unmittelbar nach Zusammengehen der Reaktionspartner ist die mit den eingesetzten Hemmstoffmengen erreichbare Inhibierung nachweisbar und bleibt auch nach längerer Inkubationszeit konstant. Die Hemmwirkung ist permanent, d.h. auch bei Lipaseüberschuß kommt es nach längeren Inkubationszeiten - untersucht wurden bis zu 24 Stunden - zu keinem Abbau des Hemmstoffes.

Diskussion

Es werden auch mit dem Lipidrohextrakt aus Erdnußsamen ähnliche Hemmkurven, wie sie bei allen Proteasenhemmstoffen gefunden werden, erhalten. Lineare Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration ist bis zu einem Hemmgrad von etwa 50 % der erreichbaren Endhemmung (68 %) gegeben. Damit ist bewiesen, daß es sich bei dem mit dem Erdnußgesamtlipidgemisch erzielbaren Hemmgrad keineswegs um einen Zufallsbefund oder etwa um Wirkungen von Effektoren handeln kann. Eine vollständige Hemmung der Wirkung des Lipasepräparates ist auch bei großem Hemmstoffüberschuß nicht

möglich. Dies wird an unspezifischen Esterasen liegen, die laut Herstellerfirma zu 20 % im verwendeten Lipasepräparat enthalten sind. Außerdem kann ein Lipasepräparat vorliegen, in dem nur bestimmte Enzymkomponenten durch den Hemmstoff inhibierbar sind. Ähnliche Beobachtungen liegen bei Bakterien- und Leukozytenproteasen vor, die ebenfalls Gemische darstellen und deren Aktivität auch nur zum Teil von spezifischen Inhibitoren gehemmt werden können.

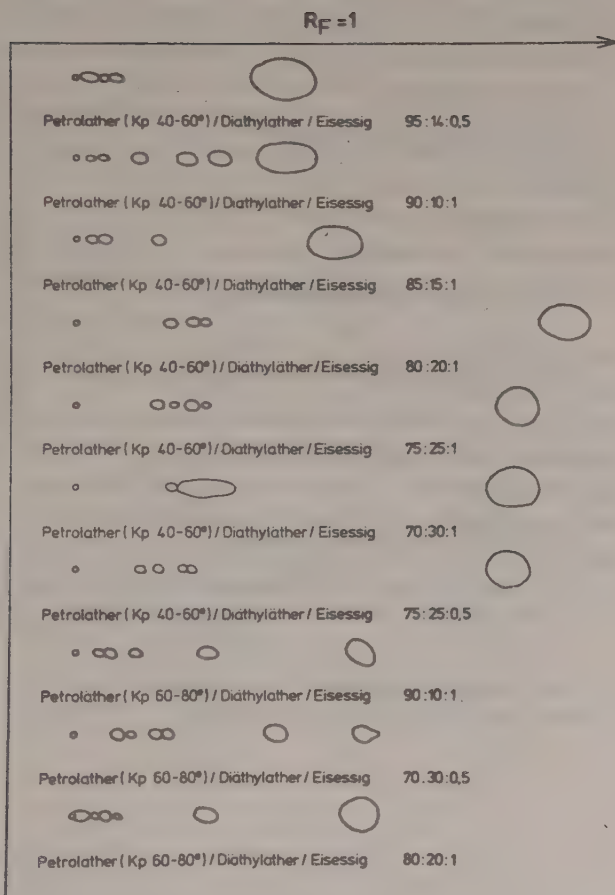
Was die Charakterisierung der Hemmung anbelangt, so handelt es sich um eine Sofortreaktion, deren Wirkung permanent ist.

3. Schritt: Dünnschichtchromatographische Vorversuche zur Ermittlung eines optimal wirkenden Trennmittels für den Erdnußgesamtlipidextrakt.

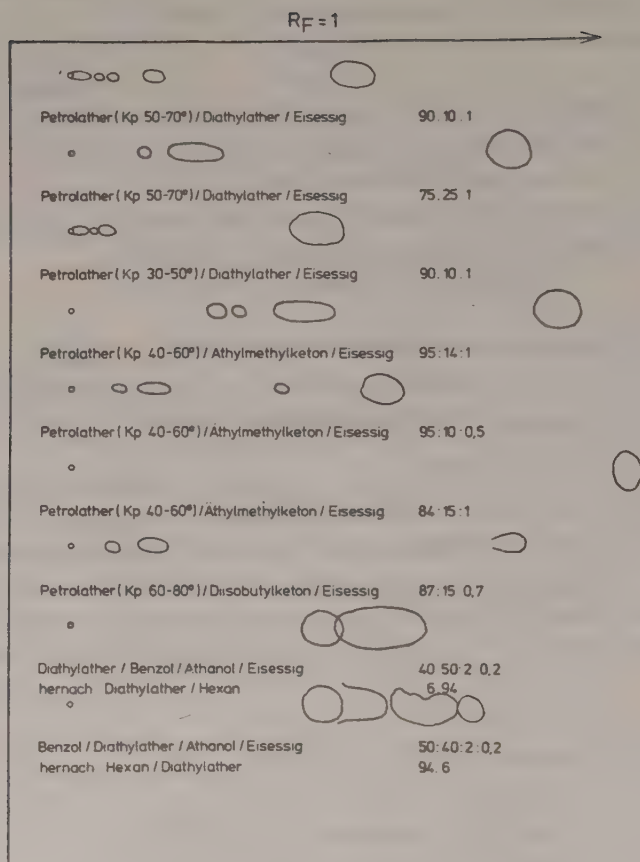
Zur Ermittlung der günstigsten Trennbedingungen im später sich anschließenden säulenchromatographischen Trennverfahren werden d.c. Vorversuche durchgeführt. (Abb. 2)

Voruntersuchungen mit 19 verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen ergeben die differenzierteste Auftrennung des Erdnußgesamtlipidgemisches mit Petroläther, Kp 40 - 60° C, Diäthyläther, Eisessig im Verhältnis 9 : 1 : 0,1, Lokalisierung der einzelnen Lipide auf den Kieselgel-Platten (Kieselgel GF 254 20 x 20 cm) nach Besprühen mit 2'7'Dichlorfluorescein im UV-Licht bei 360 mμ .

Abb. 2 Ermittlung des optimal wirkenden Trennmittels
für den Erdnuß-Lipidrohextrakt



(Noch Abb. 2)



4. Schritt: Erste präparative säulenchromatographische Vorfraktionierung des Gesamtlipidgemisches aus Pflanzensamen von *Arachis hypogaeae* bei gleichzeitiger dünnschichtchromatographischen Kontrolle der eluierten Fraktionen.

Nach Ermittlung des optimalen Trennmittels wird, wie unter "Technik der Säulenchromatographie" bereits ausführlicher beschrieben, 30 g acetonfreier Erdnußgesamtlipidextrakt auf die mit Petroläther-Diäthyläther-Eisessig-äquilibrierte Kieselgel-Säule (5 x 30 cm) aufgetragen. Es wird fraktioniert eluiert. Fraktionsvolumen betragen jeweils 15 ml. Die qualitative Analyse der eluierten Fraktionen wird am einfachsten durch fortlaufende D.C. durchgeführt. Zur Lokalisierung lipidhaltiger Fraktionen werden dazu aliquote Mengen aus jeder 3. Fraktion auf Dünnschichtplatten aufgetragen, im gleichen Lösungsmittel, mit dem sie eluiert wurden, entwickelt und mit Dichlorfluorescein sichtbar gemacht. (Abb. 3)

Fraktionen, in denen sich Lipide mit gleichem oder ähnlichem R_F -Wert finden, werden vereinigt und nach Emulgierung aliquoter Mengen auf Hemmwirkung geprüft. Zur möglichst vollständigen Auftrennung des auf die Säule aufgetragenen Lipidgemisches wird nach dem in Tabelle 1 beschriebenen Elutionsschema vorgegangen. Auf eine scharfe Grenze zwischen den Elutionsmitteln kann verzichtet werden und beim Lösungsmittelwechsel im Chromatographierohr oberhalb der Säule das vorangehende Lösungsmittel stehen gelassen werden.

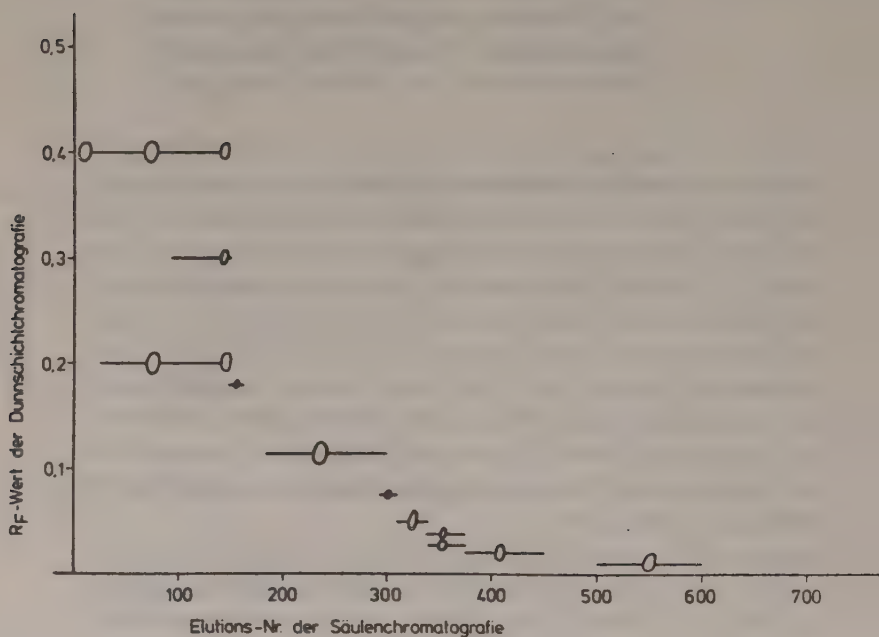


Abb. 3 Vorfraktionierung der Lipide an Kieselgel.
 Elutionsmittel s. Tabelle 1
 Säule: 5 x 30 cm, Fraktionen zu 15 ml
 Eingezeichnet sind die Dünnschichtchromatogramme
 aller von der Säule eluierten Fraktionen.
 Fraktionsbereiche, in denen die entsprechenden
 Substanzen gefunden werden, sind durch Striche
 markiert.

Tab. 1 Elutionschema zur Vorfraktionierung von 30 g Gesamtlipidgemisch aus *Arachis hypogaea*

Elutionsmittel	v/v	Menge in ml	Elutions-Nr.	R _F -Wert der eluierten Komponenten	Fraktions-Nr.
P *)	9	375	10 - 25	0.4	I
D *)	1				
E *)	0,1				
P	9	1125	26 - 100	0.4 + 0.2	II
D	1				
E	0,1				
P	9	750	100 - 150	0.4 + 0.3 + 0.2	III
D	1				
E	0,1				
P	9	150	151 - 160	0.18	IV
D	1				
E	0,1				
P	9	375	161 - 185	-	V
D	1				
E	0,1				
P	9	1560	186 - 290	0.14	VI
D	1				
E	0,1				
P	9	600	291 - 310	0.077	VII
Aceton	1				
P	9				
P	9	300	311 - 330	0.05	VIII
Aceton	1				
P	9				
P	9	585	331 - 370	0.04 + 0.03	IX
Aceton	1				
P	9				
P	5	1200	371 - 450	0.02	X
Aceton	1				
P	9				
P	9	750	451 - 500	-	XI
Aceton	1				
P	9				
Methanol	10	1500	501 - 600	0.01	XII

*) P = Petroläther, P.A. Merck, Kp 40 - 60° C, E = Essigsäure, 96 %ig, P.A. Merck
D = Diäthyläther, P.A. Merck

5. Schritt: Prüfung der durch die säulenchromatographische
Vorfraktionierung gewonnenen Lipidfraktionen
auf Hemmwirkung

Die d.c. Verlaufskontrolle der bei der Vorfraktionierung an der Kieselgelsäule erhaltenen Fraktionen ergibt nach Bewertung der R_F -Werte 12 gut voneinander zu differenzierende Lipidfraktionen bzw. Lipidgemischfraktionen. Fraktionen, in denen sich Lipide mit gleichem R_F -Wert finden, werden vereinigt, das Lösungsmittel abgedampft und das Lipid bzw. Lipidgemisch in 50 ml Petroläther/Diäthyläther wieder aufgenommen. 10 ml einer jeden Lipidfraktion werden zur Prüfung auf Antilipasewirkung entnommen. Die Prüfung auf eventuell vorhandene Hemmwirkung bei den verschiedenen Lipidfraktionen erfolgt nach der bereits beschriebenen Methode, indem nämlich das Lösungsmittel der aus jeder Fraktion entnommenen 10 ml im Vakuum entfernt wird und anschließend mit 50 ml Gummi-arabicum-Lösung eine Emulsion hergestellt wird. 10 ml einer solchen Lipidemulsion werden dann beim Hemmansatz eingesetzt bzw. zur Leerwertsbestimmung verbraucht. Der Nachweis antilipolytischer Aktivität wird nun durch Bestimmung und Auswertung der vier Ansätze - Substratleerwert, Lipidemulsionsleerwert, Lipasevergleichswert, Hemmansatz - gesichert.

Tabelle 2 gibt die mit den gewonnenen Lipidfraktionen erreichbare Hemmung in % wieder.

Tab. 2 Mit den Fraktionen I - XII erzielte Hemmung der
Lipaseaktivität in Prozent

Fraktions- Nr.	Elutions- Nr.	R _F -Wert	Hemmung der Lipase- aktivität in %
I	10 - 25	0.4	-
II	26 - 100	0.4 + 0.2	≈ 70
III	100 - 150	0.4 + 0.3 + 0.2	≈ 70
IV	151 - 160	0.18	-
V	161 - 185	-	-
VI	186 - 290	0.14	-
VII	291 - 310	0.077	15
VIII	311 - 330	0.05	-
IX	331 - 370	0.04/0.03	-
X	371 - 450	0.02	-
XI	451 - 500	-	-
XII	501 - 600	0.01	-

Diskussionsbemerkungen zu Schritt 4 und 5

Durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem unpolaren Elutionsmittel wird eine wirksame Vorfraktionierung des Erdnußgesamt-lipidgemisches erreicht. Bei diesem Schritt erscheint der Hemmstoff mit den zuerst aus der Säule austretenden unpolaren Lipiden. (Abb. 4)

Die hemmstoffhaltigen Fraktionen II + III (Elutions-Nr. 26 -150) stellen zusammen 10 % = 3 g der aufgetragenen Lipidmenge dar. Bei diesem ersten Trennungsschritt wird kein einheitliches Produkt erhalten. In den D.C. sind bei Fraktion II zwei, bei Fraktion III drei Lipidkomponenten nachweisbar. Dabei handelt es

sich bei der Komponente mit dem R_F -Wert von 0.4 um eine Hauptkomponente, während die beiden anderen mit dem R_F -Wert 0.3 und 0.2 zwei kleinere Komponenten darstellen.

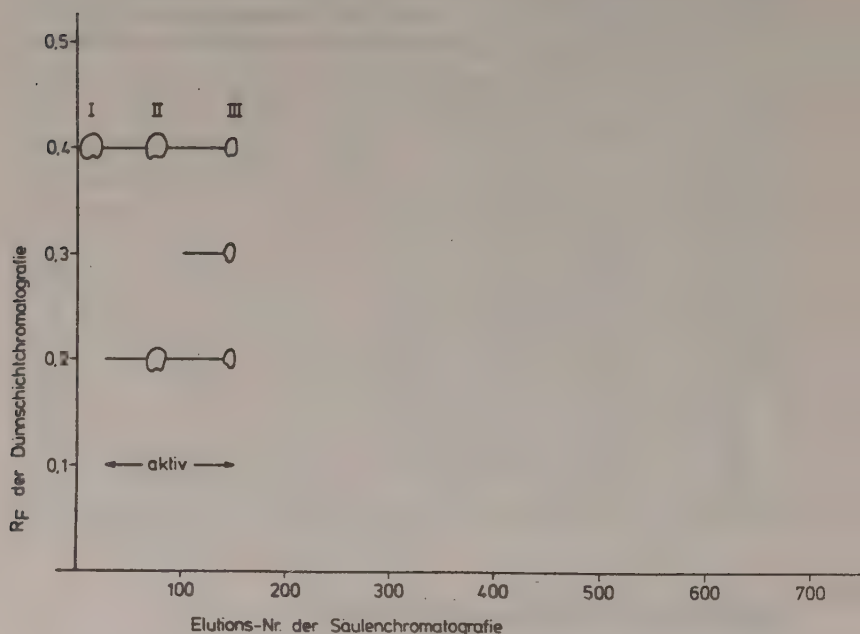


Abb. 4 Vorfraktionierung der Lipase-inhibitorisch aktiven Lipidfraktionen II + III
Elutionsmittel: Petroläther, Kp 40 - 60° C/
Diäthyläther/Essigsäure 9:1:0,1

Eingezeichnet sind die D.C. der betreffenden von der Säule eluierten Fraktionen.

Fraktionsbereiche, in denen die entsprechenden Substanzen gefunden werden, sind durch Striche markiert.

"aktiv": Diese Fraktionen enthalten Inhibitor-Aktivität.
Säule: 5 x 30 cm, Fraktionen zu 15 ml

6. Schritt: Bestimmung der Lipase-inhibitorisch wirksamen Komponente durch Auskratzen der einzelnen Lipidkomponenten auf den Dünnschichtchromatogrammen.

Die Lipide aus den Fraktionen II und III werden als 0,1 %ige Lösung in Petroläther/Diäthyläther (v/v 9:1) 1,5 cm vom unteren Plattenrand entfernt in einem Abstand von 1 - 2 cm in feinen, höchstens 1 cm großen Tropfen punktförmig mit Kapillarröhrchen auf selbst angefertigte, mit Kieselgel G 254 beschichtete Glasplatten aufgetragen und zur Entwicklung in eine gut verschlossene, mit Laufmittel-durchtränktem Filterpapier ausgekleidete Kammer gegeben. Die Front befindet sich 14,5 cm vom Startpunkt entfernt. Als Laufmittel wird P/D/E 9 : 1 : 0,1 verwendet (Petroläther Kp 40 - 60° C, p.A.). Es werden je 50 Platten mit Lipiden aus Fraktion II bzw. III beimpft. Die Rückgewinnung der getrennten Substanzen stellt kein Problem dar. Zur Lokalisation der Substanzflecken färbt man mit 2'7' Dichlorfluorescein unter Abdeckung der restlichen Platte nur einen schmalen, nicht abgedeckten Streifen in der Mitte an und legt durch parallel zur Lösungsmittelfront gezogene Striche die Positionen der d.c. getrennten Substanzen fest. Mit einem Metallspatel kratzt man das Kieselgel von den entsprechenden Bezirken auf der Platte in einen fettfreien Filterpapiertrichter. Durch Überschütten des Kieselgels mit P/D und Aceton werden die einzelnen Lipidkomponenten wieder extrahiert. Das Fließmittel wird abgedampft und die verbleibende Lipidkomponente mit Gummi-arabicum-Lösung emulgiert. Auf diesem Weg lassen sich alle Komponenten getrennt voneinander gewinnen. Die Auskratzenversuche ergeben, daß die sich d.c. am schwächsten darstellende Komponente mit dem niedrigsten R_F -Wert in den Fraktionen II und III Lipase zu hemmen vermag. (Abb. 5)

Mit dieser Komponente läßt sich eine Hemmung der Lipaseaktivität um 68 % erzielen. In den beiden anderen Komponenten konnte nur eine schwache Hemmwirkung von weniger als 3 % ermittelt werden. Um eventuell hemmende Einflüsse des Adsorbens auf die Lipase

auszuschließen, werden lipidfreie Kieselgelzonen von gleicher Länge und Menge wie die lipidhaltigen Zonen ausgekratzt, in einem Filtertrichter gesammelt, mit Lösungsmittel durchwaschen. Sodann wird das in einem Kolben gesammelte Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgedampft und die evtl. im Kolben verbleibenden Effektoren mit 50 ml Gummi-arabicum-Lösung (3,7 g G. arab. / 50 ml Aqua bidest.) emulgiert. Bei dem sich anschließenden Hemmtest mit 10 ml dieser lipidfreien Emulsion konnte weder eine aktivierende noch eine inhibierende Beeinflussung der Lipase durch evtl. filtrierte Partikel des lipidfreien Kieselgels bemerkt werden.

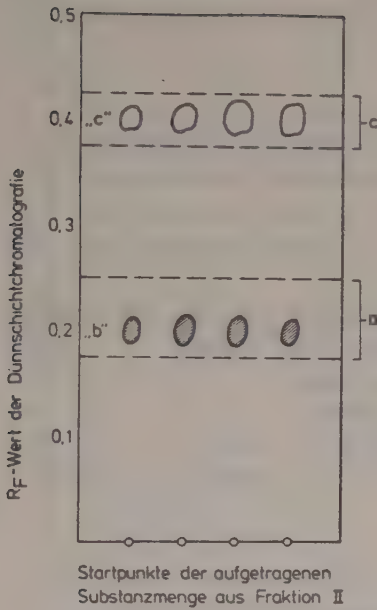


Abb. 5 a

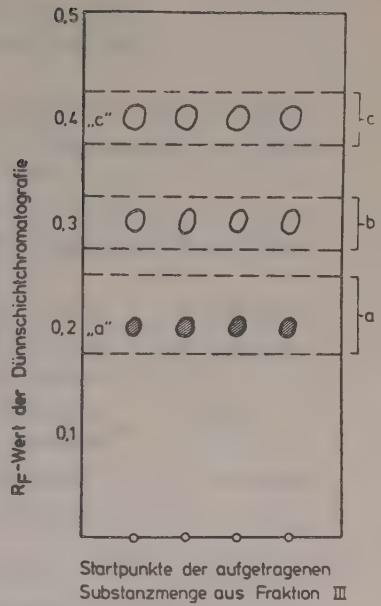


Abb. 5 b

Chromatographie der inhibitorhaltigen Fraktionen II bzw. III

Elutionsmittel:

P/D/E 9 : 1 : 0,1

Adsorbens:

mit Kieselgel GF 254 beschichtete

Glasplatten 20 x 20 cm,

Startpunkt 1,5 cm vom unteren Plattenrand,

Front: 14,5 cm vom Startpunkt entfernt

Sichtbarmachung:

2'7' Dichlorfluorescein

c - b - a :

Auskratzzonen mit den Lipidkomponenten

"c" - "b" - "a"

Schraffierter Bereich:

enthält Hemmstoff

7. Schritt: Isolierung der inhibitorisch wirksamen Komponente durch Rechromatographie der antilipolytisch aktiven Fraktionen

Die Isolierung der inhibitorisch wirksamen Substanz (Gesamtmenge 3 g) aus dem inhibitorisch aktiv wirkenden Lipidgemisch (Abb. 5 a/b) gelingt durch Rechromatographie der Fraktionen II bzw. III unter den Bedingungen der Vorfraktionierung, wobei jetzt jedoch eine längere Säule (5 x 100 cm) verwendet wird.

Säulenmaterial: Kieselgel für die Säulenchromatographie, MERCK

Elutionsmittel: Petroläther Kp 40 : 60 p.A. MERCK

Diäthyläther, p.A. MERCK

Eisessig, p.A. MERCK

Mischungsverhältnis 9 : 1 : 0,1

Sichtbarmachung: Besprühen mit 2'7' Dichlorfluorescein Sprühreagenz, MERCK

Es wird wieder fraktioniert eluiert unter fortlaufender, dünn-schichtchromatographischer Überprüfung jeden dritten Glases. Wie erwartet, werden die drei Lipidkomponenten aus den inhibitorisch wirksamen Fraktionen II und III hintereinander gewonnen. (Abb. 6)

Nur die zuletzt erscheinende Komponente "c" mit dem niedrigsten R_F -Wert vermag die Lipaseaktivität um 60 bis 70 % zu hemmen. Es werden also ähnliche Hemmgrade wie mit dem Rohextrakt erzielt.

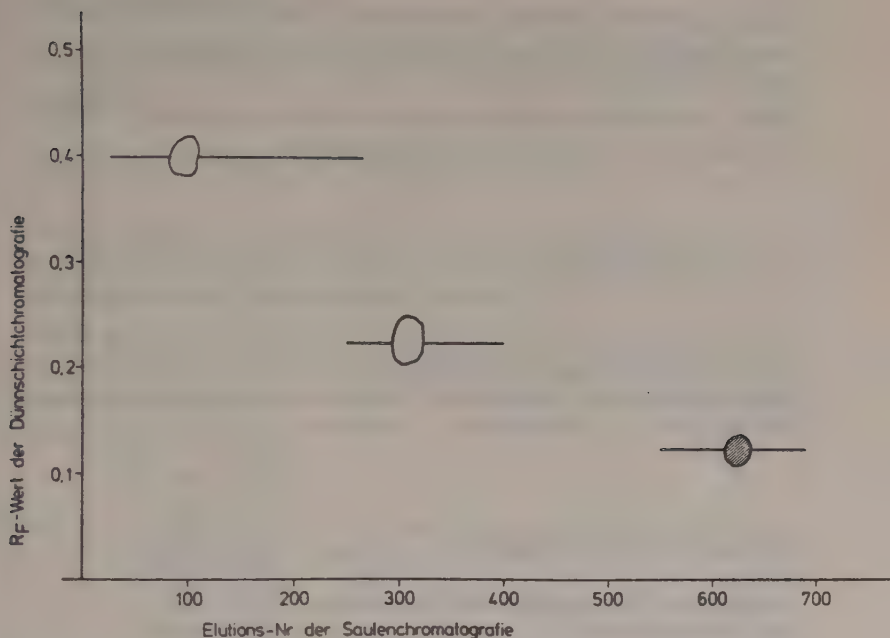


Abb. 6 Rechromatographie der inhibitorhaltigen Fraktionen aus Abb. 5 a und b.

Elutionsmittel und Darstellung wie Abb. 5 a/b.

Schraffierter Bereich enthält Hemmstoff.

Säule 5 x 100 cm, Fraktionen zu 15 ml

Diskussion

Das durch Rechromatographie gewonnene inhibitorisch aktive Lipid (R_F -Wert 0.15) stellt weniger als 2 % der Gesamtlipidmenge dar (ca. 600 mg). Mit dieser Substanz werden annähernd die gleichen Hemmkurven wie mit dem Rohextrakt erhalten. Ein Viertel der Gesamtmenge dieser aktiven Lipidkomponente vermag noch max.

Lipase zu hemmen (65 %ige Hemmung). Sie verhält sich in verschiedenen chromatographischen Systemen wie eine einheitliche Substanz. (Tabelle 3)

Es muß jedoch betont werden, daß dies noch kein Beweis für das Vorliegen einer einheitlichen Substanz ist.

Tab. 3 Fließmittel zur Prüfung des Lipidinhibitors auf Einheitlichkeit

Fließmittel	Mischungsverhältnis v/v
Petroläther 1 - Diäthyläther - Eisessig	90 : 10 : 1
	80 : 20 : 1
	70 : 30 : 1
	84 : 15 : 1
Petroläther 2 - Diäthyläther - Eisessig	90 : 10 : 1
	75 : 25 : 1
Petroläther 3 - Diäthyläther - Eisessig	90 : 10 : 1
	80 : 20 : 1
	70 : 30 : 1
Petroläther 1 - Äthylmethylketon-Eisessig	95 : 14 : 1
	84 : 15 : 1
Benzol - Diäthyläther - Äthanol - Eisessig	50 : 40 : 2 : 0,2
Benzol - Diäthyläther - Äthanol - Eisessig	50 : 40 : 2 : 0,2
danach:	
Hexan - Diäthyläther	94 : 6
Diisopropyläther - Eisessig	96 : 4
danach:	
Petroläther 1 - Diäthyläther - Eisessig	90 : 10 : 1
Chloroform - Methanol - Wasser	65 : 25 : 4
Chloroform - Methanol - Eisessig - Wasser	65 : 25 : 4 : 4
n - Propanol - Wasser	70 : 30
Eisessig - Wasser	90 : 10
Chloroform - Eisessig	96 : 4
Petroläther - Diisobutylketon - Eisessig	87 : 13 : 0,7

Petroläther 1 = Kp 40 - 60° C

Petroläther 2 = Kp 50 - 70° C

Petroläther 3 = Kp 60 - 80° C

II. Charakterisierungsverfahren

Nähere Charakterisierung der inhibitorisch aktiven Lipidkomponente

1. Schritt: Phospholipidnachweis

Es wird geprüft, ob es sich bei der isolierten, inhibitorisch aktiven Lipidkomponente um eine phospholipid- bzw. eine aminophosphatidhaltige Lipidverbindung handelt.

Hierzu wird das Lipid mehreren d.c. Systemen unterworfen. Bevorzugt werden zur Trennung von Phospholipiden bzw. Aminophosphatiden Mischungen von Chloroform und Methanol, also polarwirkende Trennungssysteme. (Tabelle 4)

Tab. 4 Fließmittel zur d.c. Trennung von phospholipidhaltigen Lipiden

Fließmittel	Mischungsverhältnis v/v
Chloroform - Methanol - Wasser	60 : 25 : 4 60 : 35 : 8
Chloroform - Methanol - Wasser	65 : 25 : 4
danach, in der zweiten Richtung:	
n Butanol - Eisessig - Wasser	60 : 20 : 20
Chloroform - Methanol - Eisessig - Wasser	60 : 34 : 4 : 2
n-Propanol - Wasser	70 : 30

Nachweismethoden

Zur Sichtbarmachung von phospholipidhaltigen Verbindungen werden die auch meist in der Papierchromatographie gebräuchlichsten Sprühreagenzien verwandt.

1. Ninhydrin-Reagenz

Diese Reaktion dient bevorzugt zum Anfärben von Aminophospha-

tiden, Aminen, und Aminosäuren. Hierbei wird die von Laufmittel befreite Dünnschichtplatte mit einer 0,2 %igen Ninhydrin-Lösung in 95 ml Butanol und 5 ml 10 %iger Essigsäure besprüht. Nach 20 Min. langem Erhitzen der Platte im Trockenschrank auf 105° C erscheinen beim Vorhandensein von Phospholipiden rot-violette Flecke auf weißem Grund.

2. Dragendorfreagenz

Mit diesem Reagenz lassen sich ebenfalls Phosphatide, bevorzugt Cholinphosphatide, nachweisen.

Zubereitung der Reagenz:

- Lösung a: 0,85 g bas. Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst.
- Lösung b: 8 g Kaliumjodid werden in 20 ml Wasser gelöst.
- Vorratslösung: Gleiche Volumina der Lösungen a und b werden gemischt.
- Sprühlösung: Vor Gebrauch werden 1 ml Vorratslösung, 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser gemischt. Nach dem Besprühen der Platte treten bei positiver Reaktion rot-orange Flecken auf.

3. Ammoniummolybdat-Perchlorsäure-Lösung

Hierbei handelt es sich um ein Universal-Reagenz.

Sprühreagenz:

- 0,5 g Ammoniummolybdat werden in 5 ml Wasser gelöst, 1,5 ml Salzsäure (25 %ig) und 2,5 ml Perchlorsäure (70 %ig) zugeführt.
- Nach Abkühlen der Lösung auf Zimmertemperatur wird mit Aceton auf 50 ml ergänzt. Diese Reagenz wird erst nach einem Tag Stehen bei Zimmertemperatur verwendet.

Nachbehandlung:

2 Minuten mit Infrarotlampe im Abstand von 30 cm bestrahlen und dann 10 Minuten langwelligem UV-Licht aussetzen, bzw.

5 - 10 Minuten auf 110° C erhitzen.

Bei positiver Reaktion treten blau-schwarze Flecken auf schwach grau gefärbtem Grund auf.

Ergebnis

Alle Reaktionen zum Nachweis einer phospholipidhaltigen Verbindung bei der vorliegenden, inhibitorisch aktiven Lipidkomponente sind negativ verlaufen.

2. Schritt: Alkalische Hydrolyse

Die alkalische Hydrolyse ("Verseifung") eines Teiles des inhibitorisch wirksamen Lipids liefert die wasserlöslichen Alkalisalze der Fettsäuren dieser Lipidkomponente sowie die unverseifbaren neutralen Verbindungen. Das "Unverseifbare" wird mit unpolaren Solventien aus der alkalisch wässrig-alkoholischen Phase entfernt. Dann werden die Fettsäuren durch Ansäuern der Lösung ihrer Salze in Freiheit gesetzt und ebenfalls mit organischen Lösungsmitteln extrahiert. Fettsäuregemisch und unverseifbarer Anteil werden nach Emulgierung aliquoter Teile mit einer Gummi-arabicum-Lösung getrennt auf inhibitorisch wirksames Verhalten gegenüber Lipase geprüft.

Arbeitsvorgang:

Es wird ein Gewichtsteil Kaliumhydroxyd in einem Gewichtsteil destillierten Wassers gelöst und diese konzentrierte Lauge nach Abkühlen mit 3 - 4 Teilen Methanol verdünnt. Die Lipidprobe wird mit der 10-fachen Menge dieser Kalium-Hydroxyd-Lösung versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach beendeter Verseifung wird der größte Teil des Methanols im Vakuum bei weniger als 50° C verdampft und der restliche Rückstand mit dem doppelten Volumen Wasser verdünnt. Durch die

Gegenwart unverseifbarer Verbindungen in dem Lipid wird die Lösung trüb.

Glycerin-Extraktion

Das Unverseifbare wird nun mehrmals mit einer dem halben Volumen der Lösung entsprechenden Menge Diäthyläther extrahiert. Die vereinigten Ätherauszüge werden mit destilliertem Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen der Lösung über wasserfreiem Natriumsulfat und Verdampfen des Äthers wird die unverseifbare Lipidfraktion in einem geeigneten Lösungsmittel (Petroläther Kp 40 : 60 und Diäthyläther 9 : 1) aufgenommen und nach Bedarf bei dem sich anschließenden Hemmtest benutzt.

Darstellung der freien Fettsäuren

Die nun von Neutralstoffen befreite wässrige Lösung der Kaliumsalze höherer Fettsäuren wird mit 5 N H_2SO_4 unter einer Ätherschicht angesäuert, bis die Lösung auf Kongopapier deutlich sauer reagiert.

Die so freigesetzten Fettsäuren werden mit destilliertem Wasser gewaschen und dann über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Der Äther wird anschließend verdampft und die Fettsäuren in 40 ml Petroläther gelöst für die anschließenden Hemmtests in dieser Form aufbewahrt.

Prüfung auf Antilipasewirkung

Nach beendeter alkalischer Hydrolyse werden wiederum aliquote Anteile des unverseifbaren wie des verseifbaren Teils des inhibitorisch wirksamen Lipids nach dem üblichen Verfahren emulgiert und auf antilipolytische Wirkung getestet.

Ergebnis

Es zeigt sich, daß die alkalische Hydrolyse zum Verschwinden der Hemmwirkung führt: Weder die verseifbare noch die unverseifbare Fraktion führen zu einer Verminderung der Lipaseaktivität.

3. Schritt: Gaschromatographische Analyse des inhibitorisch wirksamen Lipids

Aus den in Schritt 2 des Charakterisierungsverfahrens gewonnenen Erkenntnissen läßt sich schließen, daß es sich bei dem inhibitorisch aktiven Lipid um einen Glycerin-ähnlichen Stoff handeln muß.

Es liegt deshalb nahe, daß zur weiteren Charakterisierung des Lipids der Inhibitor gaschromatographisch untersucht wird.

Hierzu wird das Lipidprodukt der Methanolyse unterworfen und die dabei gewonnenen Fettsäuremethylester sowohl in Nativform als auch nach Hydrierung bestimmt.

Eine Überführung der freien Fettsäuren in Methylester vor der gaschromatographischen Auftrennung hat den Vorteil, die ausgeprägte Neigung der freien Fettsäuren, in dampfförmigem Zustand zu dimerisieren und dadurch zu asymmetrischen Banden im Gaschromatogramm mit nur allmählich auslaufender Profilbildung (tailing) zu werden, zu verhindern.

Methanolyse

Das gebräuchlichste Reagenz zur Überführung der freien Fettsäuren in Methylester ist eine 5 %ige methanolische HCL-Lösung.

Zubereitung einer 5 %igen methanolischen HCL-Lösung

In einem Destillierkolben von 1 l Inhalt, der etwa 20 g NaCl p.A. enthält und ein eingeschmolzenes kurzes Überleitungsrohr besitzt, läßt man aus einem gasdicht mit der Apparatur verbundenen Vorratsgefäß konzentrierte Schwefelsäure einfließen. Das freiwerdende Chlorwasserstoffgas leitet man aus dem Überleitungsrohr durch zwei mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllte Waschflaschen hindurch und dann mit einem spitz ausgezogenen Einleitungsrohr unter Feuchtigkeitsausschluß in stark gekühltes wasserfreies Methanol p.A. ein. Die Eintropfgeschwindigkeit der Schwefelsäure wird so einreguliert, daß das Chlorwasserstoffgas gerade noch vollständig vom Methanol absorbiert wird. Nach gewisser Zeit läßt die Gasentwicklung nach.

Durch vorsichtiges Erwärmen der Reaktionsmischung im Kolben erreicht man wieder eine befriedigende Entwicklungsgeschwindigkeit. Der HCL-Gehalt der methanolischen Lösung wird durch Titration ermittelt. In der Regel genügt aber das Auswiegen der Gewichtszunahme. Aus praktischen Gründen wird eine sehr stark konzentrierte Lösung hergestellt und später erst mit wasserfreiem Methanol auf die HCL-Endkonzentration von 5 % verdünnt.

Praktische Durchführung der Methanolyse

200 mg inhibitorisch aktives Lipid und 10 ml der 5 %igen methanolischen HCL-Lösung werden unter Stickstoff in eine Ampulle eingeschmolzen. Diese wird im Wasserbad 3 Stunden auf 80° C erhitzt. Nach Erkalten wird die Ampulle vorsichtig geöffnet und das Reaktionsgemisch mit 10 ml Aqua dest. versetzt. Darauf werden die Lipide dreimal mit je 15 ml Petroläther extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden zweimal mit je 10 ml $N K_2 CO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet.

Hydrierung der Fettsäuremethylester

Die Hydrierung der C = C Doppelbindung geschieht durch Schütteln des in einem Lösungsmittel (Methanol) gelösten Lipids in Wasserstoffatmosphäre mit geeigneten Katalysatoren für mehr als 2 Stunden. Danach wird die Lösung filtriert und eingedampft. Filter und Filterrückstand sind sorgfältig mit Äther auszuwaschen.

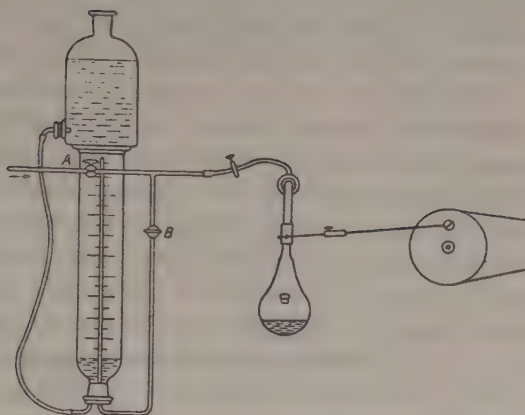


Abb. 7 Hydrierungsapparatur

Durchführung einer katalytischen Hydrierung mit Palladium

Abb. 7 zeigt die zur Hydrierung notwendige Anordnung der Apparatur. Als Sperrflüssigkeit im Gasometer wird Wasser benutzt. Das Schütteln erfolgt mit Hilfe einer Rabeschen Turbine oder eines kleinen Elektromotors durch Drehen der Exzentrerscheibe, die mit der Birne durch einen starren Draht verbunden ist. Die Schüttelbirne selbst trägt seitlich einen Tubus, der mit einem Gummistopfen verschlossen werden kann. Ihr horizontales Rohr, zugleich Achse der Schüttelbirne, läuft in einer Messinghülse, die auf beiden Seiten durch kurze, über Glas gezogene Stücke Gummischlauch festgehalten wird. Sie wird, durch einen Kork festgeklammert, in einer starken Klammer gehalten. Das Rohr steht durch einen dickwandigen Schlauch, der einen Quetschhahn trägt, in direkter Verbindung mit dem Gasometer. Dessen Meßzylinder wird von einer weiten Kühlerklammer gehalten. Vor der Hydrierung muß die ganze Apparatur auf Dichtigkeit geprüft werden:

Dazu muß der Tubus an der Birne geschlossen und das Gasometer nach Öffnen von A und B provisorisch mit Wasserstoff gefüllt werden. Nach Schließen der Glashähne wird der Stand im Glaszylinder bei gleichem Niveau des Sperrwassers mit dem Wasser im Behälter markiert und nun eine Viertelstunde bei leerer Birne geschüttelt. Ist in dieser Zeit bei gleicher Zimmertemperatur der Stand unverändert, so kann man mit der Hydrierung beginnen. Es werden jetzt 0,5 g Palladium Tierkohle in die Hydrierbirne gebracht. Dazu fügt man vorsichtig die Lösung von 200 mg inhibitorisch aktivem Lipid in 50 ml 80 %igen Methyl-Alkohol derart, daß der Katalysator vollständig bedeckt ist. Nun wird bei geschlossenem Hahn B und offenem Hahn A Wasserstoff aus der Bombe durch die Birne geleitet, bis Luft in ihr und der ganzen Leitung verdrängt ist. Schon vorher hat man den Gasometer (1 l Inhalt) und die Rohrleitung bis zu Hahn B mit Wasser gefüllt. Jetzt verschließt man den Tubus der Birne und verdrängt nach Öffnung des Glashahnes B bei tief gestelltem Wasserbehälter das Wasser durch Wasserstoff. Danach wird die Verbindung mit der Wasserstoffflasche gelöst, der Stand des Glases wie bei der Dichtigkeitsprüfung abgelesen und unter geringem Überdruck die Schüttellei in Gang gebracht. Nach ca. 8 Stunden wird die Hydrierung beendet. Man filtriert vom Katalysator die Lipidlösung ab und verdampft den Methylalkohol. Die methylierten Fettsäuren und das Hydrierungsprodukt werden in dieser Form zur gaschromatographischen Untersuchung verwendet.

Apparative Einrichtung

Gaschromatograph "Modell 840" der Firma PACKARD INSTR. INC., USA, Apparat mit Argondetektor ausgerüstet.

Säule, modifiziert nach Craig und Murphy, besteht zu 10 % aus Bernsteinsäure-äthylen-glykopolyester und läßt eine vollständige Trennung der gesättigten und ungesättigten Fettsäuremethyl-estergemische zu.

Auftragen der Substanz

Als zweckmäßigste Art der Probeneinführung in den Gasraum kann

Injektion der Substanzlösungen - die Fettsäuremethylestergemische liegen als 2 %ige Lösungen in Chloroform vor - mit Hilfe der Microliterspritze der Firma Hamilton Inc., USA, durch ein temperaturbeständiges Diaphragma angesehen werden.

Betriebsbedingungen

Einlaßtemperatur	230° C
Säulentemperatur	171° C
Detektortemperatur	213 - 215° C
Auslaßtemperatur	240° C
Trärgas	Argon
Argondrucktemperatur	1,6 kg/cm ²
Druckabfall längs der Säule	1,5 - 1,6 kg/cm ²
Druckflußrate	90 - 100 ml/cm
Säulenabmessung	180 x 0,4 cm

Ergebnis

Abb. 8 zeigt die Gaschromatogramme der nach Methanolyse des Inhibitors erhaltenen Fettsäuremethylester, nativ a und hydriert b.

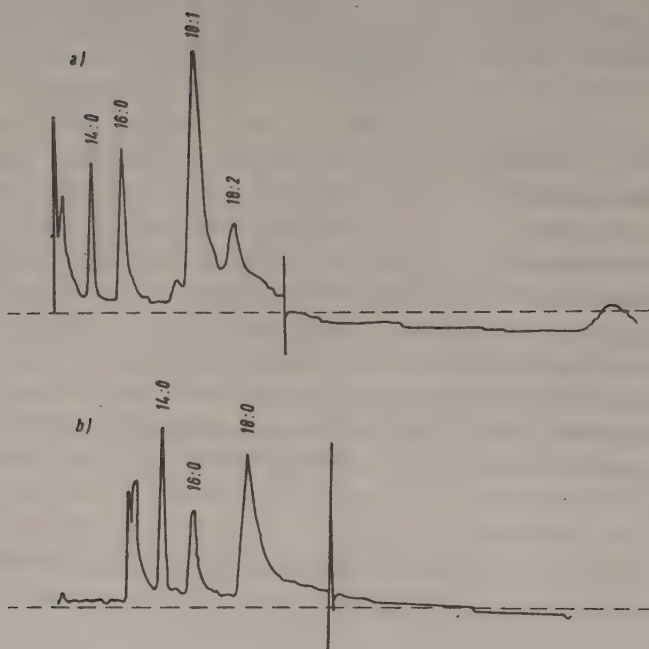


Abb. 8 Gaschromatogramme der nach Methanolyse des Inhibitors erhaltenen Fettsäuremethylester, nativ a und hydriert b

Ergebnis der gaschromatographischen Untersuchung der nativen und hydrierten Fettsäuremethylester

Es werden die Fettsäuren $C_{14}:0$, $C_{16}:0$, $C_{18}:1$ und $C_{18}:2$ gefunden, wobei $C_{14}:0$ in nur sehr geringen Mengen vorkommt. Das Chromatogramm des aliquoten hydrierten Anteils erlaubt, die Fettsäuren als Myrestin-, Palmitin-, Oleäure und Linolensäure zu identifizieren.

Hydrierung der intakten inhibitorisch wirksamen Lipidkomponente führt nicht zum Verlust der Hemmwirkung, wie vorgenommene Hemmtests mit der hydrierten Substanz zeigten.

E) SCHLUSSBEMERKUNG

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß auch für lipolytische Enzyme natürliche Inhibitoren vorkommen, die eigentlich Substrate für die entsprechenden Enzyme darstellen müßten. Bei den Proteasen wird die Hemmung durch definierte Inhibitor-Proteine mit speziellen Eigenschaften im Sinne einer limitierten Proteolyse bewirkt. Diese Inhibitoren zeigen in Bezug auf ihre Zusammensetzung keinerlei Besonderheiten, und doch wird durch bestimmte Strukturelemente eine hohe Spezifität und Selektivität gegenüber den zu hemmenden Proteasen erreicht.

Der beschriebene Lipasehemmstoff zeigt ebenfalls keine besonderen Merkmale; es handelt sich höchstwahrscheinlich um ein Triglycerid. Welche Struktureigenheiten dieses Triglycerid oder diesen triglycerid-ähnlichen Stoff zum Lipasehemmstoff machen, ist beim gegenwärtigen Stand noch unbekannt.

Die Suche nach weiteren Inhibitoren lipidspaltender Enzyme dürfte allein durch folgende pathogenetische Überlegung gerechtfertigt sein. Wie in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben, standen bei der Frage nach Entstehung der Pankreatitis bisher die proteolytischen Enzyme und ihre Inhibitoren im Vordergrund. Seit jedoch nachgewiesen ist, daß durch Instillation von Lipase in das Pankreasgangsystem in Gegenwart aktivierender Gallensäure typische Parenchymnekrosen und Fettgewebsnekrosen hervorgerufen werden, wird der Lipasewirkung bei der Entstehung von Pankreatitiden ursächliche Bedeutung zugeschrieben. Auch durch Lysolecitine, die Folgeprodukte der Wirkung von Phospholipase A, können Pankreasnekrosen erzeugt werden. Deshalb ist die Beteiligung auch dieses Enzyms an der Entstehung der Pankreatitis äußerst wahrscheinlich, weshalb man nach Möglichkeiten sucht, die Wirkung dieses Enzyms durch therapeutische Maßnahmen zu hemmen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Beck, I.T., Pinter, E., Solymar, J., McKenna, R.D.,
Ritchie, A.C.: Gastroenterology 43, 60 (1962)
2. Creutzfeldt, W., Söling, H.D., Ketterer, H.: Klin. Wschr.
41, 1002 (1963)
3. Creutzfeldt, W., Schmidt, H., Horbach, I.: Klin. Wschr. 43,
15 (1965)
4. Doerr, W., Diezel, P.B., Grözing, K.H., Lasch, H.G.,
Nagel, W., Rossner, J.A., Wanke, U., Willig, F.: Klin. Wschr.
43, 125 (1965)
5. Schmidt, H.: Internist, 11. Jg., Heft 3, 105 (1970)
6. Schmidt, H., Creutzfeldt, W.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med.
72, 719 (1966)
7. Vogel, R., Trautschold, I., Werle, E.: Natürliche Proteinase-
Inhibitoren. Stuttgart: Georg Thieme 1966
8. Hafter, E.: Praktische Gastroenterologie
Stuttgart: Georg Thieme, 473 (1973)
9. Creutzfeldt, W., Schmidt, H.: Scandinavien J. Gastroentero-
logie. 5 Suppl. 6, 47 (1970)
10. Geokas, U.C.: Arch. Pathol. 86, 135 (1968)
11. Balo, I.: Beitr. path. Anat. 92, 14 (1933)
12. Wanke, U.: Experimentelle Pankreatitis. Stuttgart: Georg Thieme
(1968)
13. Anderson, U.C., Needleman, S.B., Grammatica, L., Toranto, I.R.,
Briggs, D.R.: Arch. Surg. 99, 185 (1969)
14. Schmidt, H., Creutzfeldt, W.: T. Gastroent. 1970
15. Schmidt, H., Creutzfeldt, W.: Scand. J. Gastroent. 4, 39 (1969)
16. Zieve, L., Vogel, W.C., Kelly, W.D.: J. appl. Physiol. 18, 77
(1963)
17. Schmidt, H., Habermann, E.: Klin. Wschr. 45, 163 (1967)
18. Gjone, E., Ofstadt, E., Morton, P.F., Amundsen, E.: Scand. J.
Gastroent. 2, 181 (1967)
19. Arnesjö, B.: Pancreatic phospholipase, Physiological che-
mistry and possible aetiologic role in acute pancreatitis.
Thesis, University of Lund (1968)
20. Bauer, E., Frey, E.K., Kraut, H., Schultz, F., Werle, E.:
Naturwiss. 17, 672 (1929)
21. Bauer, E., Frey, K., Kraut, H., Werle, E.: Naturwiss. 17, 672
(1929)
22. Kraut, H., Frey, E.K., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 192, 1 (1936)

23. Kraut, H., Frey, E.K., Werle, E., Schultz, T.: Z. physiol. Chem. 230, 259 (1934)
24. Werle, E., Maier, L., Ringelmann, E.: Naturwiss. 39, 328 (1952)
25. Werle, E., Appel, W.: Z. Naturforsch. 14b, 385 (1959)
26. Werle, E.: Z. physiol. Chem. 338, 228 (1964)
27. Trautschold, I.: Vortrag Gemeinsame Tagung der dtsch., franz. und schweiz. Biochemiker, Zürich (1960)
28. Trautschold, I., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 325, 48 (1961)
- 29 Webster, U.E., Pierce, I.V.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 107, 186 (1961)
30. Prado, I.L., Prado, E.S., Brandi, C.M.W., Katchburian, A.V.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 186 (1963)
31. Kunitz, M., Northrop, J.H.: J. Gen. Physiol. 19, 991 (1936)
32. Kunitz, M.: Science 101, 668 (1945)
33. Kunitz, M.: J. Gen. Physiol. 29, 149 (1946)
34. Kunitz, M.: J. Gen. Physiol. 30, 291 (1947)
35. Kunitz, M.: J. Gen. Physiol. 32, 241 (1948)
36. Kazal, L.A., Spicer, D.S., Brahinsky, R.A.: J. Amer. Chem. soc. 70, 3034 (1948)
37. Fritz, H., Trautschold, I., Hartwich, G., Werle, E.: Fed. Europ. Biochem. Soc. IInd Meeting, Wien (1965)
38. Fritz, H., Hartwich, G., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 345, 150 (1966)
39. Fritz, H., Schult, H., Neudecker, M., Werle, E.: Angew. Chem. 78, 775 (1966)
40. Fritz, H.: Habilitationsschrift, Med. Fak. Univ. München (1968)
41. Feeney, R.E., Allison, R.G.: Evolutionary Biochemistry of Proteins, New York (1969)
42. Feeney, R.E.: Biochemistry, Washington, 7, 2886 (1968)
43. Crestfield, A.M., Moore, S., Stein, W.H.: J. Biol. Chem. 238, 622 (1963)
44. Finkenstadt, W.R., Laskowski jr., M.: J. Biol. Chem. 240, (1965)
45. Finkenstadt, W.R., Laskowski jr., M.: J. Biol. Chem. 242, 771 (1967)
46. Fritz, H., Fink, E., Gebhardt, M., Hochstraßer, K., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 350, 933 (1969)
47. Fritz, H., Fink, E., Meister, R., Klein, G.: Z. physiol. Chem. 351 (1970)

48. Fritz, H., Gebhardt, M., Fink, E., Schramm, W., Werle, E.:
Z. physiol. Chem. 350, 129 (1969)
49. Fritz, H., Hartwich, G., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 345,
150 (1966)
50. Fritz, H., Hochstraßer, K., Werle, E.: Z. Analyt. Chem. 234,
452 (1968)
51. Fritz, H., Oppitz, K.-H., Gebhardt, M., Oppitz, I., Werle, E.:
Z. physiol. Chem. 350, 91 (1969)
52. Fritz, H., Trautschold, I., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 342,
253 (1965)
53. Fritz, H., Trautschold, I., Werle, E., in Bergmeyer, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse, Weinheim 1970
54. Greene, L.J., Fackre, D.S., Rigbi, M.: Federat. Proc. 25,
3405 (1966)
55. Trautschold, I., Werle, E., Haendle, H., Sebening, H., in
Henning, Heinkel und Schön: Pathogenese, Diagnostik, Klinik
und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas.
Schattauer-Verlag, Stuttgart (1964)
56. Kassell, B., Laskowski, M.: Biochem. Biophys. Res. Comm.
17, 792 (1964)
57. Kassell, B., Radicevic, M., Ausfield, M.J., Laskowski Sr., M.:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 255 (1965)
58. Hochstraßer, K., Werle, E., Schramm, W., Fritz, H., Schwarz, S.:
Z. physiol. Chem. 350, 893 (1969)
59. Hochstraßer, K., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 350, 249 (1969)
60. Hochstraßer, K.: Hemmung von Proteasen-Inhibitoren
1. Int. Cong. for clin. chem. Geneva/evion (1969)
vol. 2: Clinical Enzymology, pp. 00-00
1 Korgen, Basel N.Y. (1970)
61. Muss, M., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 348, 337 (1967)
62. Muss, M., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 350, 249 (1969)
63. Muss, M., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 350, 897 (1969)
64. Muss, M., Ilchmann, K., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 350,
929 (1969)
65. Hochstraßer, K., Werle, E.: Z. physiol. Chem. 249 (1969)
66. Hochstraßer, K., Schramm, U., Fritz, H.: Z. physiol. Chem.
350, 893 (1969)
67. Manfield, V. A., Ziegelhöffer, Horakora, Z., Hladovec, J.:
Naturwiss. 46, 172 (1959)
68. Shain, Y., Mayer, A.M.: Physiol. Plant. 18, 853 (1965)
69. Laskowski Sr., M., Wu, F.C.: J. Biol. Chem. 204, 797 (1953)

70. Haynes, R., Feeney, E.R.: Biochemistry 7, 2547 (1968)
71. Fritz, H., Tscheche, H.: Proc. Int. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors. Berlin: W. de Gruyter 1971
72. Wohlgemuth, J.: Biochem. Z. 9, 1 (1908)
73. Rona, P., Michaelis, L.: Biochem. Z. 31, 345 (1911)
74. Willstätter, R.F., Waldschmidt, Seitz, E., Memmen, F.: H 125, 93 (1923)
75. Gomori, G.: Proc. Soc. exp. biol. Med. 58, 362 (1945)
76. Tietz, N.W., Borden, T., Stepleton, J.D.: J. clin. Path. 31, 148 (1959)
77. Desnuelle, P., Constantin, J., Baldy, J.: Bull. Soc. Chem. biol. 37, 285 (1955)
78. Desnuelle, P., Reboud, S.P., Ben Abdeljlil, A.: Pure appl. Chem. 3, 423 (1962)
79. Machis Mouren, G., Sarda, L., Desnuelle, P.: Arch. Biochem. Biophys. 83, 309 (1960)
80. Seligman, A.M., Nachlas, M.M.: J. clin. Invest. 29, 31 (1950)
81. Fried, R., Hoeflmayr, J.: Therapie der Gegenwart 12, 1788 (1969)
82. Vogel, W.C., Zieve, L.: Clin. Chem. 9, 168 (1963)
83. Mahadevan, S., Dillard, C.J., Tappel, A.L.: Anal. Biochem. 27, 387 (1969)
84. Härtel, A., Banauch, D., Helger, R.: Z. Klin. Chem. 9, 396 (1971)
85. Rick, W.: Z. Klin. Chem. 7, 530 (1969)
86. Weber, H.: Dtsch. med. Wschr. 26, 1170 (1965)
87. Desnuelle, P.: Biochimie 53, 841 (1971)
88. Maylié, M.F., Charles, M., Desnuelle, P.: Biochim. Biophys. Acta 178, 196 (1969)
89. Desnuelle, P., Savary, P.: J. Lipid Res. 4, 369 (1963)
90. Mendele, B., Myers, D.K., Ulydert, J.E., Ruys, A.C., Bruyn, W.M.D.: Brit. J. Pharmacol. 8, 217 (1953)
91. Brockerhoff, H.: Biochim. Biophys. Acta 159, 296 (1968)
92. Rick, W., Heinkel, K., Schmidt, H., Sickinger, K.: Störungen der Verdauung und Resorption. Wissenschaftl. Berichte Merck, Darmstadt, 1971
93. Rick, W.: Internist 11, 110 (1970)
94. Rick, W., in Henning, N., Heinkel K., Schön, H., Hrsg.: Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas. Schattauer, Stuttgart

95. Archibold, R.M.: J. biol. chem. 143, (1946)
96. Boissonos, R.A.: Helv. chim. Acta 31, 1571 (1948)
97. Senior, J.R.: J. Lipid Res. 5, 485 (1964)
98. Munk, J.: Arch. Pathol. Anat. Physiol. 80, 10 (1880)
99. Pope, J.L., McPerson, J.C., Tidwell, H.C.: J. biol. Chem. 241, 2306 (1966)
100. Di Nella, R.R., Ming, H.C., Pork, C.R.: J. biol. Chem. 235, 3076 (1960)
101. Cohen, M., Morgan, R.G.H., Hofmann, A.F.: Gastroenterology 60, 1 (1971)
102. Goebell, H.H.: Internist 3, 117 (1970)
103. Aldridge, W.N.: Biochem. J. 53, 110 (1953)
104. Augustinsson, K.B.: Nature 181, 1786 (1958)
105. Julien, R., Conioni, P., Rathelot, J., Sarda, L., Plummer, T.H.: Biochim. Biophys. Acta 280, 215 (1972)
106. Benzonana, G., Desnuelle, P.: Biochim. Biophys. Acta 164, 47 (1968)
107. Entressangles, B., Desnuelle, P.: Biochim. Biophys. Acta 159, 285 (1968)
108. Benzonana, G.: Biochim. Biophys. Acta 151, 137 (1968)
109. Balls, A.K., Matlack, M.B., Tucker, J.W.: J. Biol. Chem. 122, 125 (1937)
110. Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E., Memmen, E.: Z. physiol. Chem. 125, 93 (1923)
111. Dietmann, K., Jukran, W.: Naunyn-Schmiedebergs-Arch. Pharmacol. 269, 497 (1971)
112. Klissiunis, M., Myconiatis, M.: Naunyn-Schmiedebergs-Arch. Pharmacol. 269, 469 (1971)
113. Mattson, F.H., Volpenhern, R.H., Benjamin, L.: J. Biol. Chem. 245, 5335 (1970)
114. Rick, W.: Verh. dtsch. Gesell. inn. Med. 74, 230 (1968)
115. Rick, W., Schmidt, F.W.: Prakt. Enzymology. R. Huber, Bern - Stuttgart (1968), S. 160 - 161
116. Vogel, W.C., Zieve, L.: Clin. Che. 2, 963 (1968)
117. Bunch, L.D., Emerson, R.L.: Clin. Che. 2, 75 (1956)
118. King, J.: Practical Clinical Enzymology
D. van Nostrand Company Ltd., London, S. 252 (1965)
119. Tswett, M.: Proc. Warsaw Sec. Nat. Sci. Biol. Section 14, 6 (1903)

120. Randerath, K.: Dünnschicht-Chromatographie
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 2. Auflage 1965
121. Stahl, E.: Dünnsch.-Chr.
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1967, 2. Aufl.
122. Martin, A.J.P., Synge, R.L.M.: Biochem. J. 35, 1358 (1948)
123. Stahl, E.: Pharmazie 11, 633 (1956)
124. Stahl, E.: Chemiker Ztg. 82, 323 (1958)
125. Stahl, E.: Pharmaz. Rdsch. 2., 1 (1959)
126. Firmenschrift: Dünnschichtchir. nach E. Stahl, E. Merck AG,
Darmstadt 1962
127. Fa. Desaga GmbH, Heidelberg. Vertretung in den USA:
C.A. Brinkmann Co. Inc., Cantiague Road, Westbury, N.Y.
128. Freeman, C.P., Wyt, D.: J. Lip. Res. 7, 324 (1966)
129. Hirsch, J., Ahrens, E.H.J.: J. Biol. Chem. 233, 311 (1958)
130. Zöllner, N., Kirsch, K.: Z. ges. exp. Med. 134, 10 (1960)
131. Keulemans, A.J.M.: Gas Chromatography, Chapman and Hall Ltd.,
London (1959) Reinhold Publ. Corp., New Y., übersetzt von
E. Cremer, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße (1959)
132. Bayer, E.: Gas-Chromatographie, 2. Auflage, Springer-Verlag,
Berlin (1962)
133. Kaiser, R.: Chromatographie - de Gasphase, Teil I - IV,
Bibliographisches Institut, Mannheim
134. Leibnitz, E., Struppe, H.G.: Handbuch der Gaschr.
Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße (1966)
135. Littlewood, A.B.: Gas-Chromatography, Principles, Techniques
and Applications. Acad. Press, New York (1962)
136. Purnek, H.: Gas-Chromatography, Wily New York (1962)
137. Seligman, A.M., Glotier, P.: Bull. New Engl. med. Center 12,
28 (1950)
138. Hochstraßer, K., Feuth, H., Werle, E.: Hoppe Seyler's Z.
Physiol. Chem. Bd. 353, 855 (1972)
139. Seligman, A.M., Nachlas, M.M.: J. clin. Invest. 29, 31 (1950)
140. Nothmann, M.M., Pratt, J.H., Callow, A.D.: A.M.A. Arch. inter-
nat. Med. 100, 221 (1957)
141. Nachlas, M.M., Blackburn, R.: J. biol. ch. 230, 1051 (1958)
142. Borgström, B., Erlanson, C.: Eur. J. Biochem. 37, 60 (1973)

Lebenslauf

=====

Am 8. Februar 1945 wurde ich in Vught/Holland als Sohn meiner Eltern August Feuth und Irene Feuth, geb. Bolsinger, geboren. Meine Schulausbildung erfolgte am Gymnasium Canisianum, Lüdinghausen/Münster, wo ich am 5. 3. 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Das Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1964 an der Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich im Juni 1970 das Medizinische Staatsexamen absolvierte.

Nach der Medizinalassistentenzeit an der Chirurgischen und Medizinischen Universitätsklinik sowie am Institut für Klinische Chemie der Universität München erlangte ich im November 1971 die Approbation als Arzt.

Seit November 1970 befaßte ich mich mit dem experimentellen Teil dieser Arbeit, den ich im Februar 1973 mit den vorliegenden Ergebnissen abschloß.



